



PATENT  
0760-0329P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Yasuhiko MUNAKATA et al. Conf.: UNKNOWN  
Appl. No.: 10/768,030 Group: UNKNOWN  
Filed: February 2, 2004 Examiner: UNKNOWN  
For: NOVEL HUMAN PARVOVIRUS B19 RECEPTOR AND  
USES THEREOF

LETTER

**MAR 10 2004**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

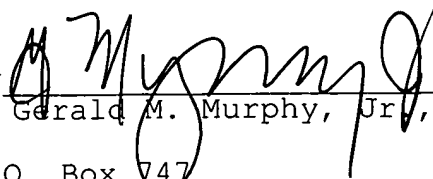
<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	2003-205279	August 1, 2003

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By   
Gerald M. Murphy, Jr., #28,977

P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

GMM/las  
0760-0329P

Attachment(s)

Munakata et al  
10/768,030  
Filed 02/02/2004  
BSKB, LLP  
0760-0329P  
(703) 205-8000  
1 of 1

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 8 月 1 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 2 0 5 2 7 9

[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 2 0 5 2 7 9 ]

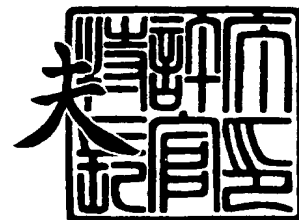
出 願 人  
Applicant(s): 富士レビオ株式会社



2 0 0 4 年 2 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 1 2 0 7 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 03865

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区錦ヶ丘 5 - 1 7 - 1

    【氏名】 宗像 靖彦

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区上杉 4 - 2 - 4 2

    【氏名】 斎藤 貴子

【特許出願人】

    【識別番号】 000237204

    【氏名又は名称】 富士レビオ株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100088546

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 谷川 英次郎

    【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 053235

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ヒトパルボウイルス B 1 9 レセプター及びその用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該配列において少数のアミノ酸残基が置換し若しくは欠失し、若しくは該配列に少数のアミノ酸残基が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有しヒトパルボウイルス B 1 9 と結合するタンパク質から成る、ヒトパルボウイルス B 1 9 に対するレセプター。

【請求項 2】 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該配列において 1 個ないし数個のアミノ酸残基が置換し若しくは欠失し、若しくは該配列に 1 個ないし数個のアミノ酸残基が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有しヒトパルボウイルス B 1 9 と結合するタンパク質から成る、請求項 1 記載のヒトパルボウイルス B 1 9 に対するレセプター。

【請求項 3】 前記タンパク質は、配列番号 1 記載のアミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のヒトパルボウイルス B 1 9 に対するレセプター。

【請求項 4】 前記タンパク質は、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のヒトパルボウイルス B 1 9 に対するレセプター。

【請求項 5】 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヒトパルボウイルス B 1 9 に対するレセプター又はそのウイルス結合性断片から成るヒトパルボウイルス B 1 9 結合剤。

【請求項 6】 請求項 5 記載の結合剤を含んで成るヒトパルボウイルス B 1 9 測定用試薬。

【請求項 7】 請求項 5 記載の結合剤を含んで成るヒトパルボウイルス B 1 9 吸着剤。

【請求項 8】 請求項 5 記載の結合剤を含んで成るヒトパルボウイルス B 1 9 の感染抑制剤。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヒトパルボウイルス B 1 9 に対するレセプターとヒトパルボウイルス B 1 9 の結合を阻害する物質

を有効成分として含有するヒトパルボウイルス B 19 の感染抑制剤。

【請求項 10】 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヒトパルボウイルス B 19 に対するレセプターと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を有効成分として含有する請求項 9 記載の感染抑制剤。

【請求項 11】 細胞に、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヒトパルボウイルス B 19 に対するレセプターの発現能を付与する工程、及び／又は P 抗原を発現能を付与する工程を含んでなるヒトパルボウイルス B 19 吸着性又は感染感受性細胞の製造方法。

【請求項 12】 細胞母集団から、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヒトパルボウイルス B 19 に対するレセプターを発現する細胞を単離する工程、及び P 抗原を発現する細胞を単離する工程を含んでなるヒトパルボウイルス B 19 吸着性又は感染感受性細胞の製造方法。

【請求項 13】 細胞母集団から、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヒトパルボウイルス B 19 に対するレセプターが提示されている細胞を単離する工程を含むヒトパルボウイルス B 19 吸着性又は感染感受性細胞の製造方法。

【請求項 14】 細胞母集団から、P 抗原が提示されている細胞を単離する工程を含む請求項 13 記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【発明の属する技術分野】

#### 【0001】

本発明は、新規なヒトパルボウイルス B 19 レセプター及びその用途、並びに同レセプターを提示する細胞の製造方法に関する。

#### 【従来の技術】

#### 【0002】

ヒトパルボウイルス B19（以下、単に「B19」と略すことがある）は小児の伝染性紅斑（非特許文献 1），妊婦の感染による胎児水腫（非特許文献 2），急性赤芽球癆（非特許文献 3），成人の多発性関節炎（非特許文献 4、5）など様々な病態の原因となる一本鎖 DNA ウイルスである。B19 の感染レセプターとして、赤血球膜上に発現する血液型糖脂質の P 抗原（Globoside）が 1993 年 Young らにより同

定された（非特許文献6）。この事は、臨床的にB19感染抵抗性を示す例では、P抗原発現を欠くPhenotypeを呈することでも支持され（非特許文献7）、P抗原がB19の感染レセプターであり、P抗原を高発現する赤芽球系細胞が感染標的細胞であると理解されるに至った。B19感染症では、赤芽球系細胞への感染による貧血が主な症状となる。しかし、白血球減少症や血小板減少症（非特許文献8）、自己抗体の出現などの免疫異常を示す現象が観察されること、B19感染後に関節リウマチに進展する症例が報告されていること、末梢血中顆粒球や関節でB19DNAが証明されるなど（非特許文献9、10、11）、B19の赤芽球系細胞への感染のみでは理解することが困難な病態を呈する場合があります、B19感染症ではP抗原を介した赤芽球細胞への感染以外の未知のB19感染様式の存在も指摘されている。また、一方では、B19感染感受性細胞株での研究より、P抗原発現量とB19感染効率に相関を認めがたいことから、P抗原以外のB19感染関連分子（co-receptorなど）の存在が指摘されている（非特許文献12）。このようにP抗原とは異なるB19感染関連分子の存在が予測されているが、現時点では不明である。ウイルスの感染レセプターとして、しばしば複数の分子が関連し、それらがco-receptorとしてウイルス感染に関与する機能が報告されている。例えば、human immunodeficiency virus (HIV) ではケモカインレセプターが（非特許文献13）、エコーウイルスではvery late antigen 2 (VLA2) が（非特許文献14）、adeno associated virus 2 (AAV2) では $\alpha V\beta 5$ インテグリン（非特許文献15）がそれぞれco-receptorとして機能し、これらの分子がウイルス感染感受性や感染特異性を決定する重要な役割を担っていることが証明されている。B19においても他のウイルス同様にP抗原以外の感染レセプターまたはco-receptorを持つ可能性が推定される。B19感染に関与する分子を明らかにすることは、B19の感染メカニズムの解明に資するのみならず、B19感染に伴う様々な病態の理解に貢献し、B19感染症の診断・治療にも有用な情報となりうる。

### 【0003】

本願発明者らはこれまでにB19感染後関節リウマチへ進展していった患者の関節滑膜において、滑膜組織中に浸潤したT・Bリンパ球、樹状細胞、マクロファージ等の免疫細胞でB19構造蛋白B19-VP1蛋白が検出されることを見出し、免疫細胞

がB19の感染標的細胞となることを報告してきた（非特許文献10）。これらの免疫細胞にはB19のレセプターであるP抗原の発現は乏しいとされており、P抗原蛋白以外の分子を介した免疫細胞へのB19感染の可能性が示唆された。

【 0 0 0 4 】

【非特許文献1】 Plummer FA, Hammond GW, Forward K, Sekla L, Thompson LM, Jones SE, Kidd IM, Anderson MJ: An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection. N Engl. J. Med. 1985, 313: 74-9.

【非特許文献2】 Anand, A., Gray, E.S., Brown, T., Clewley J.P., Cohen, B.J: Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. N Engl. J. Med. 1987, 316: 183-186.

【非特許文献3】 Kelleher, J.F., Luban, N.L., Mortimer, P.P., Kamimura, T: Human serum "parvovirus": a specific cause of aplastic crisis in children with hereditary spherocytosis. J. Pediatr. 1983, 102: 720-722

【非特許文献4】 White DG, Woolf AD, Mortimer PP, Cohen BJ, Blake DR, Bacon PA: Human parvovirus arthropathy. Lancet 1985, 233: 419-21.

【非特許文献5】 Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. Lancet 1985, Feb 23: 422-5.

【非特許文献6】 Brown, K.E., Anderson, S.M., & Young, N.S: Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. Science 1993, 262: 1141-117.

【非特許文献7】 Brown, K.E. et al: Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). N Engl J Med. 1994, 330: 1192-1196.

【非特許文献8】 Barlow, G.D., & McKendrick, M.W. Parvovirus B19 causing leucopenia and neutropenia in a healthy adult. J Infect. 2000, 40: 192-195.

【非特許文献 9】 Woolf, A.D., Campion, G.V., Chishick, A., Wise, S., Cohen, B.J., Klouda, P.T., Caul, O., Dieppe, P.A: Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. Arch. Intern. Med. 1989, 149: 1153-1156.

【非特許文献 1 0】 Takahashi, Y., Murai, C., Shibata, S., Munakata, Y., Ishii, T., Ishii, K., Saitoh, T., Sawai, T., Sugamura, K., Sasaki, T: Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1998, 95: 8227-8232.

【非特許文献 1 1】 Stahl, H.D., Pfeiffer, R., von Salis-Soglio, G., Emmrich, F: Parvovirus B19-associated mono- and oligoarticular arthritis may evolve into a chronic inflammatory arthropathy fulfilling criteria for rheumatoid arthritis or spondylarthropathy. Clin. Rheumatol. 2000, 19: 510-511.

【非特許文献 1 2】 Weigel-Kelley, K.A., Yoder, M.C., & Srivastava, A: Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. J. Virol. 2001, 75: 4110-4116.

【非特許文献 1 3】 Doranz, B.J., Berson, J.F., Rucker, J., & Doms, R.W: Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Immunol Res. 1997, 16: 15-28.

【非特許文献 1 4】 Bergelson, J.M., Shepley, M.P., Chan, B.M., Hemler, M.E., & Finberg, R.W: Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. Science. 1992, 255: 1718-1720.

【非特許文献 1 5】 Summerford, C., Bartlett, J.S., & Samulski, R.J: AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. Nat. Med. 1999, 5: 78-82.

【非特許文献 1 6】 Miyagawa, E., Yoshida, T., Takahashi, H., Yamaguchi, K., Nagano, T., Kiriya, Y., Okochi, K., Sato, H: Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its applica



tion to titration of B19 infectivity. J. Virol. Methods 1999, 83: 45-54

【非特許文献 1 7】 Yamaguchi K, Miyagawa E, Dan M, Miyazaki T, Ikeda H: Cellulose hollow fibers (BMMS) used in the filter membrane can trap human parvovirus (B19). Electron Microscopy 2002, 2: 115-116

【非特許文献 1 8】 Muryoi, T., Sasaki, T., Tamate, E., Takai, O., Harata, N., Yoshinaga, K: Antigen inhibition of the interaction between murine monoclonal anti-idiotypic antibodies and human monoclonal anti-DNA antibodies. Tohoku J. Exp. Med. 1987, 152: 253-258.

【非特許文献 1 9】 Mimori, T. et al: Isolation and characterization of cDNA encoding the 80-kDa subunit protein of the human autoantigen Ku (p70/p80) recognized by autoantibodies from patients with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1990, 87: 1777-1781.

【非特許文献 2 0】 Tanaka, T. et al: Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1994, 91: 3082-3086.

【非特許文献 2 1】 Brown, C.S., Salimans, M.M., Noteborn, M.H., & Weiland, H.T: Antigenic parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in large quantities in a baculovirus expression system. Virus Res. 1999, 15: 197-211.

【非特許文献 2 2】 Kajigaya, S. et al: Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1991, 88: 4646-4650.

【非特許文献 2 3】 Nussenzweig, A. et al: Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. Nature 1996, 382: 551-555

【非特許文献 2 4】 Finnie, N.J., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Jeggo,

P.A., & Jackson, S.P: DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1995, 92: 320-324.

【非特許文献 2 5】 Lynch, E.M., Moreland, R.B., Ginis, I., Perrine, S.P., & Faller, D.V: Hypoxia-activated ligand HAL-1/13 is lupus autoantigen Ku80 and mediates lymphoid cell adhesion in vitro. Am. J Physiol. Cell Physiol. 2001, 280: 897-911.

【非特許文献 2 6】 Ginis, I., & Faller, D.V: Hypoxia affects tumor cell invasiveness in vitro: the role of hypoxia-activated ligand HAL1/13 (Ku86 autoantigen). Cancer Lett. 2000, 154: 163-174.

【非特許文献 2 7】 Teoh, G. et al: The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells. J. Clin. Invest. 1998, 101: 1379-1388.

【非特許文献 2 8】 Le Romancer M, Reyl-Desmars F, Cherifi Y, Pigeon C, Bottari S, Meyer O, Lewin MJ: The 86-kDa subunit of autoantigen Ku is a somatostatin receptor regulating protein phosphatase-2A activity. J. Biol. Chem. 1994, 269: 17464-8.

【非特許文献 2 9】 Mostafa SS, Miller WM, Papoutsakis ET: Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. Br. J. Haematol. 2000, 111: 879-89.

【非特許文献 3 0】 Hevehan DL, Papoutsakis ET, Miller WM: Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis. Exp. Hematol. 2000, 28: 267-75.

【非特許文献 3 1】 Sylvie Pillet, Nathalie Le Guyader, et al. Hypoxia up regulation the expression of human parvovirus B19. IX parvovirus workshop (2002 Italy)

【特許文献 3 2】 特開平11-32757号公報

【特許文献 3 3】 Sakata H. et al. Vox Sang.77(4), 197-B203,1999)

【0 0 0 5】

**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、P抗原以外の新規なヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提供すること、及び、該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを利用した、ヒトパルボウイルスB19を測定用試薬、吸着用試薬及び感染抑制剤を提供することである。また、本発明の目的は、該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターとヒトパルボウイルスB19との結合を阻害することによりヒトパルボウイルスB19の感染を抑制する手段を提供することである。さらに、本発明の目的は、該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提示する細胞の製造方法を提供することである。

**【0006】****【課題を解決するための手段】**

本願発明者らは、鋭意研究の結果、全身性エリテマトーデス(SLE)例で認められる自己抗体の標的自己抗原として見いだされた80kDaのタンパク質であるKu80がヒトパルボウイルスB19の感染レセプターであることを見出し、本発明を完成した。

**【0007】**

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該配列において少数のアミノ酸残基が置換し若しくは欠失し、若しくは該配列に少数のアミノ酸残基が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有しヒトパルボウイルスB19と結合するタンパク質から成る、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提供する。また、本発明は、上記本発明のヒトパルボウイルスB19に対するレセプターから成るヒトパルボウイルスB19結合剤を提供する。さらに、本発明は、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターとヒトパルボウイルスB19の結合を阻害する物質又はその結合性断片を有効成分として含有するヒトパルボウイルスB19の感染抑制剤を提供する。また、本発明は、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提示する細胞の製造方法を提供する。

**【0008】****【発明の実施の形態】**

上記の通り、本願発明者らはKu80が、P抗原以外の新たなヒトパルボウイルス B19に対するレセプターであることを見出した（以下ヒトパルボウイルス B19をB19と略す。）。Ku80は、Ku80はSLE例で認められる自己抗体の標的自己抗原として見いだされた80kDaの蛋白である。Ku80は細胞内蛋白として局在し、機能することが知られている。Ku80は、Ku70とヘテロダイマーを形成し（非特許文献19）、細胞内でDNA依存性プロテインキナーゼの調節因子としてDNA修復や組換えに関与するとされている（非特許文献23、24）。一方Ku80は、低酸素環境下で血管内皮細胞やヒト筋肉腫細胞株RD細胞表面に発現が認められるようになり、リンパ球系細胞の接着に関係しているとの報告もある（非特許文献25、26、27）。またヒト胃癌細胞株HGT-1細胞表面に発現しているKu80はソマトスタチンレセプターとして機能し、シグナル伝達に関与することが報告されている（非特許文献28）。以上の報告にみられるように、Ku80は細胞表面で発現し、機能を有する場合は知られている。

#### 【0009】

Ku80遺伝子の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示し、そのアミノ酸配列のみを取り出して配列番号1に示す（GenBank Accession No. M30938）。

#### 【0010】

なお、一般に、生理活性を有するペプチドでは、該ペプチドのアミノ酸配列において少数のアミノ酸が置換し、欠失し、挿入され又は付加された場合であっても、その生理活性が維持される場合があることは当業者によって認められているところである。従って、配列番号1に示すKu80のアミノ酸配列において、少数のアミノ酸が置換し、欠失し、挿入され又は付加されたペプチドあって、B19との結合能を維持するものは、Ku80と同様に利用することができ、本発明の範囲に含まれる。ここで、「少数」とは、1個ないし数個であることが好ましく、又は配列番号1のアミノ酸配列と90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するものが好ましい。なお、アミノ酸配列の相同性は、FASTAのような周知のコンピューターソフトを用いて容易に算出することができ、このようなソフトはインターネットによっても利用に供されている。

## 【0011】

下記実施例で実験的に確認されたとおり、Ku80はB19と特異的に、すなわち、Ku80がB19の感染レセプターとして機能し、B19がKu80のリガンドとして機能して両者は結合する。従って、Ku80はB19に対する特異的な結合剤として用いることができる。ここで、「結合剤」とは、B19に特異的に結合させ、この特異的な結合を何らかの用途に利用するためのものであり、より具体的な用途の好ましい例としては、B19測定用試薬、B19吸着剤及びB19感染抑制剤を挙げることができる。以下、これらについてさらに説明する。

## 【0012】

本発明のB19の感染レセプターは、B19と特異的に結合するので、本発明のレセプターを用いてB19を測定することができる。なお、「測定」には検出と定量の両者が包含される。これは、抗原と抗体との特異的結合（抗原抗体反応）を利用した免疫測定方法と同様に行うことができる。例えば、本発明のレセプターを固相化し、B19を含む検体を固相化レセプターと接触させ、洗浄後、蛍光標識や酵素標識などの標識を付した抗B19抗体と反応させ、洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中のB19を測定することができる。本発明のレセプターは、タンパク質であるので、レセプターの固相化は、周知の方法、例えば、ポリスチレン製のマイクロプレートのウェルやニトロセルロースフィルター等への物理吸着や、官能基を有する担体へのアミノ基を介した共有結合等により容易に行うことができる。B19感染レセプターを直製応用したB19の検出法としてはP抗原をリガンドとしてReceptor-mediated hemagglutination assay（非特許文献33）が開発され、輸血血液中のB19のスクリーニングに用いられているが、Ku80をP抗原に代えることにより新規なReceptor-mediated hemagglutination assayを確立することが可能である。特にP抗原は糖鎖抗原であり化学合成が困難である一方、Ku80はペプチドであり、コード遺伝子配列も明らかにされており、リコンビナント蛋白質として大量生産が可能であり、断片としての産生も容易である。

## 【0013】

また、本発明のB19の感染レセプターは、B19と特異的に結合するので、

本発明のレセプターはB 1 9の吸着剤としても用いることができる。B 1 9は、小型のウイルスであり、フィルターで除去するのが困難である。本発明のレセプターを固相化したフィルターや、本発明のレセプターを固相化した担体を充填したカラムに、B 1 9を含む試料を通すことにより、B 1 9を除去することができる。また、固相化レセプターに吸着されたB 1 9は、尿素処理、グアニジン処理、p H変化、塩濃度変化等の処理によって遊離されるので、上記固相化レセプターは、B 1 9の精製又は濃縮に利用することができる。

#### 【0014】

本発明のB 1 9に対するレセプターは、B 1 9と特異的に結合するので、本発明のレセプターとB 1 9の結合を阻害することで、B 1 9の感染を抑制することができる、B 1 9感染抑制剤として利用することができる。さらに、本発明のレセプターとB 1 9を用いて結合を阻害する物質を選択することにより、B 1 9感染抑制剤として利用する物質を見出すことができる。本発明のレセプターとB 1 9の結合を阻害する物質としては、本発明のレセプターに由来するポリペプチド及びそのウイルス結合性断片、本発明のレセプターに抗原抗体反応する抗体及びその抗原結合性断片、B 1 9に由来するポリペプチド及びそのレセプター結合性断片並びにB 1 9に抗原抗体反応する抗体及びその抗原結合性断片等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。本発明のレセプターとB 1 9の結合を阻害する物質は、例えば以下の手順に従って選択することができる。精製されたKu80、遺伝子工学的手法により得られたKu80又はKu80発現細胞を固相化する。そこに、B19又はr B19ECPとともに選択される物質を添加し反応させる。洗浄後、固相のKu80に結合したB19又はr B19ECPを抗B19抗体で定量的に測定することにより、Ku80とB 1 9の結合を阻害する物質を見出すことができる。結合を阻害する物質としては、各種のランダムライブラリーから選択することもできるが、以下のような手順で、結合を阻害する可能性の高い物質を絞り込むことができる。例えば、Ku80を固相化したカラムを作成し、B19をプロテアーゼ等により断片化したペプチドを通過させ、洗浄後溶出する。ここで、得られたKu80に対して結合性を有するB 1 9由来のペプチドは、Ku80とB19の結合を阻害する可能性が高い物質である。また、さらにこのB 1 9由来のペプチドを常法に従って免疫する

ことによって、Ku80とB19の結合を阻害する可能性が高い抗B19抗体を得ることができる。

#### 【0015】

尚、本発明における感染抑制剤は、有効成分としての本発明のレセプターまたはその一部に結合する抗体、好ましくはヒト化抗体、またはモノクローナル抗体、好ましくはヒトモノクローナル抗体若しくはその一部と薬学的に許容され得る担体とからなる医薬品として有用な医薬組成物を意味する。このような薬学的に許容され得る担体としては、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味料、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤などが含まれる。投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは医薬組成物としての感染抑制剤に含有される活性成分（抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から $1000\text{mg}$ の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る液性担体中に $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $10\text{mg}/\text{ml}$ の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。

#### 【0016】

このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において $1\text{kg}$ 体重あたり、 $1\mu\text{g}$ ～ $100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}$ ～ $50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。また、注射

剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、滅菌フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

#### 【0017】

また、B19の複製には、Ku80が寄与しているので、Ku80遺伝子の発現を抑制するアンチセンスRNAやRNAiは、B19の感染抑制に利用することができる。従って、上記感染抑制剤の場合と同様な疾患の治療又は予防に用いることができる。

#### 【0018】

本発明により、Ku80がB19のレセプターであることが明らかにされ、また、下記実施例に示すとおり、B19は、Ku80とP抗原の両者を提示する細胞によく感染してよく複製されることから、Ku80とP抗原の両者を提示するB19感染感受性細胞にB19を感染させることにより、B19を効率良く増殖させることができる。B19の量産は、B19の治療薬等の研究や、抗B19抗体の作製に有用である。

#### 【0019】

本発明のB19レセプター及びP抗原を提示するB19吸着性又は感染感受性細胞は、生体内のリンパ系細胞、赤芽球細胞又は細胞バンク等より入手可能な株化された細胞から選別することができる。また、遺伝子工学的手法によりB19レセプター及びP抗原を発現させた細胞から選別することもできる。なお、ここで、「吸着性」は、細胞がB19を特異的に（すなわちレセプターとリガンドとして）吸着することを意味し、下記実施例に具体的に記載するようなELISA等の免疫測定により吸着が確認された場合に吸着性があると判定できる。また、「感染感受性」とは、B19がその細胞内で増殖する、すなわち、ウイルスのコピー数が増大することを意味し、これは下記実施例に具体的に記載するような定量的PCR法等により確認することができる。コピー数の増大が確認された場合に感染感



受性があると判定できる。

#### 【0020】

B19レセプター及びP抗原を発現する細胞は、例えば、Ku80遺伝子及びP抗原関連遺伝子を細胞に導入し発現させることによって得ることができる。Ku80遺伝子は、配列番号2に示す塩基配列を有していることが知られているので、Ku80の発現は、Ku80遺伝子を常法である遺伝子工学的手法により細胞に導入し、細胞内で発現させることにより行うことができる。一方、P抗原は糖鎖抗原であるので、P抗原の生合成に必要な一連の糖転移酵素遺伝子を細胞に導入し発現させ、細胞内でP抗原を合成させることにより行うことができる。Ku80とP抗原の両者を発現する細胞は、生体内若しくは培養条件下でP抗原を発現している細胞にKu80遺伝子を導入することによって、又は、Ku80を発現している細胞にP抗原関連遺伝子を導入することによって製造することもできるし、Ku80及びP抗原のいずれも有さない細胞に両者の遺伝子を導入することによっても製造することができる。導入する遺伝子数が少なく操作が簡便性であるという点で、P抗原を有する細胞にKu80遺伝子を導入するのが好ましい。

#### 【0021】

本発明のB19レセプター及びP抗原を提示するB19感染感受性細胞は、例えば、市販の抗Ku80抗体及び抗P抗原抗体を用いて、蛍光抗体法又はフローサイトメーター等により識別、分離することができる。B19感染感受性細胞を識別、分離する際には、抗Ku80抗体若しくは抗P抗原抗体のいずれか一方を用いて識別、分離された細胞に対して、もう一方の抗体を用いて再度同じ操作を行うこともできるが、両者の抗体を同時に反応させることによりフローサイトメーターを用いて一工程で識別、分離することもできる。

#### 【0022】

上記の工程により得られたB19レセプター及びP抗原を提示している細胞がB19の感染における感受性を有しているか否かの確認は、以下のように行うことができる。通常の培養条件下で培養された上記の細胞に、B19を添加し、一定期間培養した後、該細胞を回収する。B19が細胞に感染したことの確認は、B19の感染、増殖により細胞内で産生されるB19抗原の発現を抗B19モノクロ

ーナル抗体を用いた免疫学的手法で定性的又は定量的に検出することにより行うことができる。又は、B19の感染後、細胞内で複製されるB19遺伝子を分子生物学的手法で検出することにより行うことも可能である。

### 【0023】

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

### 【0024】

#### 1. 方法

##### 1-1. 材料

##### (1) 細胞

KU812Ep6は慢性骨髄性白血病細胞株よりエリスロポエチン存在下でKU812限界希釈法によりクローニングされたB19易感染性の赤芽球系の細胞株である（特開平11-32757、非特許文献16）。ヒトTリンパ球系細胞株H9はATCCより、ヒト単球系細胞株U937、ヒト大腸腺癌細胞株SW620、ヒト膀胱癌細胞株T24は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより分与された。KU812Ep6は10% ウシ胎児血清（FBS）、6 IU/mlエリスロポエチン（Kirin Brewery）を加えたRPMI培地で、H9、U937、SW620は、10%FBS加RPMI培地で、T24は10%FBS加MEM培地で培養した。培養条件は37℃、5%CO<sub>2</sub>とした。

### 【0025】

骨髄血単核球細胞は発熱や貧血等の検査のため骨髄検査を受けた例（造血器腫瘍を除く）から被検者の同意を得て採取した。得られた骨髄サンプルからFicoll-Hypaque（Pharmacia）のよる比重遠心法にて骨髄血単核球を分離し、1 IU/mlエリスロポエチン（Kirin Brewery）、10%FBS加RPMI培地で培養した。

### 【0026】

##### (2) ヒトパルボウイルスB19

B19ウイルスとして急性B19感染患者から採取した血清を使用した。本血清は $2 \times 10^{14}$  コピーのB19ウイルスを含むが、抗B19-IgM抗体、抗B19-IgG抗体はともに検出感度以下であった。対照にはB19未感染者でB19DNA、抗B19-IgM抗体、抗B19-

IgG抗体ともに検出されない健常人血清を使用した。血清は使用直前まで-80℃にて保存した。

#### 【0027】

結合抑制実験で使用した精製B19ウイルスは、B19陽性血清からカラムクロマトグラフィーで精製し、感染性を保持することが確認されたインタクトな精製B19ウイルスを用いた（非特許文献17）。

#### 【0028】

##### (3) 抗体

B19の構造蛋白であるVP1を認識する抗体PAR3（マウス，モノクローナル）は東北大学免疫学分野，菅村博士より供与された。Ku80のN末端を認識する抗Ku80抗体（マウス，モノクローナル）はOncogene社より，C末端を認識する抗Ku80抗体（マウス，モノクローナル）はPharmlngen社より得た。抗Ku70抗体（マウス，モノクローナル），抗CD106抗体（マウス，モノクローナル）はPharmlngen社より，抗グロボシド（P抗原）抗体（ウサギ，ポリクローナル）であるGL4はMatreya社より得た。1F5はヒト抗DNA抗体の08-1イディオタイプに対する抗イディオタイプモノクローナル抗体（非特許文献18）で陰性コントロールとして用いた。PE標識抗ウサギ抗体，PE標識抗Glycophorin A 抗体，PE標識抗CD3 抗体，PE標識抗CD20 抗体，PE標識抗CD14 抗体，PE標識抗CD56 抗体は日本ベクトン・ディッキンソン社より得た。

#### 【0029】

##### (4) リコンビナント蛋白

リコンビナントKu80（rKu80），リコンビナントKu70（rKu70）は三森博士（京都大学）より供与された（非特許文献19）。Soluble CD26（sCD26）は森本博士（東京大学）より供与された（非特許文献20）。リコンビナントB19 empty capsid protein（rB19ECP）はデンカ生研より分与された（非特許文献21、22）。

#### 【0030】

ビオチン化rB19ECPは，rB19ECPをスルホ-LC-ビオチン（Pierce）で氷上2時間反応させ，ビオチン化した。ラベルされなかったスルホ-LC-ビオチンはPBSによ

る透析で除いた。同様の方法で牛血清アルブミン (BSA) もビオチン化し、対照とした。

#### 【 0 0 3 1 】

rB19ECPを結合したセファロース (rB19ECP-セファロース) はプロトコールに従いCNBr 活性化セファロース (Pharmacia Biotech) とrB19ECPを用いて作製した。また対照としてBSA-セファロースも用意した。

#### 【 0 0 3 2 】

##### 1-2. B19のin vitroでの感染

各種感染標的細胞浮遊液 ( $1 \times 10^5$ 細胞/100  $\mu$ l培養液) に、 $2 \times 10^{10}$  コピーのB19ウイルスを添加して氷上で1時間吸着させた。過剰なB19を4回洗浄除去した後、DNA抽出を行い、定量PCRにてB19コピー数を算出した。感染実験では37  $^{\circ}$ C、5 %CO<sub>2</sub>下で2日間培養後にDNAを抽出し、B19ウイルス量を定量した。抑制実験においては各種抗体をB19吸着前に氷上で1時間反応させた。

#### 【 0 0 3 3 】

##### 1-3. B19DNAの測定

まず、細胞と培養液に最終濃度が10 mM Tris (pH7.6), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5%SDSとなるようにDNA抽出液を添加し、プロテアーゼK (0.2  $\mu$ g/ml) で37  $^{\circ}$ C、24 時間処理後、フェノール-クロロホルム法にてDNA抽出を行った。抽出したDNAは10 mM Tris (pH7.6), 0.1mM EDTA溶液で溶解した。

#### 【 0 0 3 4 】

“TaqMan PCR Reagent Kit” (ロシュ社) を用いて、B19ウイルスゲノムの構造蛋白遺伝子VP1領域 (nt.2598-2752) に対する定量的PCRによりB19のウイルス量を測定した。未知測定試料であるDNA (0.5  $\mu$ g) に、dUTP (400  $\mu$ M), dATP (200  $\mu$ M), dCTP (200  $\mu$ M), dGTP (200  $\mu$ M), MgCl<sub>2</sub> (3.5 mM), forward プライマー (200 nM), reverse プライマー (200 nM), プローブ (100 nM), Amp Erase UNG (0.01 U/ $\mu$ l), Ampli Taq Gold (0.025 U/ $\mu$ l), 更にTaqMan バッファを加えて全量50  $\mu$ lとして反応させた。forward プライマーの塩基配列は5'-c cctagaaaacccatcctctgtg-3'であり、reverse プライマーのそれは 5'-aggttctgc atgactgctactgg-3'である。蛍光色素FAMで標識された検出用プローブとしてVP1

ゲノムのnt.2692-2718を認識する5'-tcatggacagttatctgaccacccccca-3を用いた。増幅条件は50℃で2分間、95℃ 10分間反応の後 95℃で15秒、60℃で1分間を40 サイクル行い、すべての反応は ABI/PRISM 7700 Sequence Detector System を用いて行った。

#### 【 0 0 3 5 】

##### 1-4. B19結合分子の同定

###### (1)B19の細胞結合

PBSで浮遊した細胞にビオチン化rB19ECPを添加し、氷上で30分間反応させた。細胞をPBSにて洗浄後、アビチン-FITC (Sigma社) を加え同様に反応させ、FACSCaliber (Becton Dickinson社) にて解析した。

#### 【 0 0 3 6 】

###### (2)B19結合蛋白の同定

約 $1 \times 10^6$ のH9細胞にスルホ-LC-ビオチン (Pierce社) を加え室温で30分間反応させ、H9細胞表面をビオチン化した。ラベルされなかったビオチンを冷PBSで3回洗浄して取り除いた後、細胞溶解液 (100 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris (pH7.6), 2 mM PMSF) で細胞を浮遊し、4℃で90分間反応後、遠心により核抽出成分を取り除き、細胞溶解液とした。細胞溶解液とセファロースを4℃で24時間ゆるやかに攪拌しながら反応させ、セファロースに非特異的に結合する蛋白を取り除いた。遠心後、上清にrB19ECP-セファロースを加え、4℃で2時間ゆるやかに攪拌しながら反応させた。rB19ECP-セファロースを冷洗浄液 (20 mM Tris (pH7.6), 0.1 % Triton X-100, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) で3回洗浄後、サンプルバッファー (0.125M Tris-HCl, 10% 2-メルカプトエタノール, 4%SDS, 10%ショ糖, 0.004%ブロムフェノールブルー) を加え5分間ボイルした。

#### 【 0 0 3 7 】

rB19ECPに結合した蛋白は7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、PVDF膜に転写した。1% スキムミルクで室温1時間ブロッキングした後、アビジン-HRPを室温で1時間反応させ、ECLキット (Pharmacia 社) によりビオチン化蛋白を検出した。

## 【0038】

蛋白同定用には細胞表面をビオチン化せず、同様の方法にて細胞溶解液とrB19 ECP-セファロースを反応させ、rB19ECP結合蛋白を分離した。7.5% ゲルで電気泳動後、CBB染色液（0.1 %SDS, 0.25 %クマシーブリリアントブルー R250, 45 %エタノール, 10 %酢酸溶液）にて蛋白染色を行い、目的蛋白のゲルを切り出し、リジレンドペプチダーゼを用いて消化した後、MALDI-TOF MS解析に用いた。

## 【0039】

## (3) ウエスタンブロッティング解析

上述した方法で分離したrB19ECP結合蛋白または抗Ku80抗体により免疫沈降した蛋白をPVDF膜に転写し、1% スキムミルクで室温1時間ブロッキングした。抗Ku80抗体を最終濃度0.5  $\mu$ g/mlとなるように 0.1% Tween20入りPBSで希釈し、PVDF膜に室温で1時間浸漬させながら反応させた。その後0.1% tween20入りPBSにて膜を洗浄し、2次抗体のペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（1:2000）と室温で1時間反応させた。化学発光の検出はECL detection reagent（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて行った。

## 【0040】

## 1-5. ELISA法による結合抑制実験

酵素標識抗体測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA）はパルボIgG-EIA”生研”キット（デンカ生研）中のrB19ECPを固相化したプレートを用いて行った。至適ビオチン化リコンビナントKu80を様々な競合物質存在下で室温45分間反応させた後、kit付属の洗浄液で洗浄した。アビジン-HRP（1:1000）を添加し室温で45分間反応させた後、基質を用いて検出した。陰性コントロールとして、ビオチン化BSAを用いた。

## 【0041】

## 1-6. フローサイトメトリー解析

各種細胞株におけるB19感染状態を把握するためにフローサイトメトリーで解析を行った。感染細胞標的細胞の培養液中にB19陽性血清を1:1000の割合で添加し、48時間培養した後、感染細胞をPBSで洗浄、4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1%サポニン、0.05%NaN<sub>3</sub>を含むハンクス溶液にて細胞膜透過処理を行った。

。次に抗B19-VP1抗体PAR3を添加し、氷上で30分間反応後、PBSで洗浄し、FITC標識抗マウスIgG 抗体 (SIGMA社) を同様に反応させた。

#### 【0042】

細胞表面の抗原検出は、PBSに浮遊させた細胞に1次抗体 (5  $\mu$ g/ml) を加えて、氷上で30分間反応させた後、細胞をPBSで洗浄し、2次抗体であるFITC標識抗マウスIgG抗体またはPE標識抗ウサギ抗体 (Jackson Immuno Research社) を氷上で30分間反応させた。

#### 【0043】

骨髓細胞は抗Ku80抗体、FITC抗マウス抗体で染色後、PE標識モノクローナル抗体を氷上で30分間反応させて2重染色した。

#### 【0044】

すべての解析はFACSCaliber (Becton Dickinson社) により行った。

#### 【0045】

### 1-7. 蛍光抗体染色

#### (1) B19の感染の検出

B19陽性血清 (1:1000) 存在下で48時間培養した感染細胞をPBSで洗浄してスライドガラスにマウントし風乾した。アセトン-メタノール (1:1) 液で-20℃, 20分間固定後、抗B19-VP1抗体PAR3で37℃で30分間反応させ、PBSで洗浄し、ビオチン標識抗マウスIgG 抗体 (SIGMA社) (1:500) を同様に反応させた。次にAvidine-FITC (1:200) を37℃で30分間反応させた。蛍光顕微鏡で観察した。

#### 【0046】

#### (2) B19ECPとKU812Ep6との結合

KU812Ep6細胞にビオチン化rB19ECPを添加し、氷上で1時間反応させた。その後、PBSで細胞を洗浄後、抗Ku80抗体 (5  $\mu$ g/ml) を添加し、室温で30分間反応させた。次に、ビオチン化rB19ECPを検出するために、アビジン-FITC (1:100) を、抗Ku80抗体を検出するためにTRITC標識抗マウスIgG抗体 (1:50) を添加し、室温で30分間反応させた。染色後、細胞をスライドガラスにマウントし、蛍光顕微鏡にて観察した。

#### 【0047】

## 2 結果

### 2-1. B19の細胞株への吸着, 感染実験

まず, 免疫細胞を含む各種細胞株に対するB19のin vitroにおける感染状態を測るためにB19陽性血清を細胞株培養液に添加し48時間培養後, フローサイトメトリー法により細胞表面及び細胞内のB19-VP1蛋白の検出を行った。従来よりB19感染高感受性を示すことが知られているKU812Ep6細胞株では抗VP1抗体にて強陽性を示す細胞集団と弱陽性を示す集団に分離表現されることが示された(図1)。強陽性を示す細胞集団はKU812Ep6でのみ観察され, マクロファージ系細胞株U937, Tリンパ球系細胞系細胞株H9では弱陽性を示す集団のみが観察された。一方, ヒト膀胱癌細胞株T24, ヒト大腸腺癌細胞株SW620では弱陽性も強陽性も観察することはできなかった。また, 蛍光抗体法でこれらの細胞株におけるB19構造蛋白VP1を検出すると, KU812Ep6のみで強陽性細胞が観察された(図1)。

#### 【0048】

細胞株を使用してB19の吸着, 感染についてP抗原発現との関連で検討した。KU812Ep6, U937, H9の細胞株ではそれぞれ, 1細胞あたり13, 9, 8コピーのB19の吸着がみられた。しかしT24, SW620では0.2コピーのB19DNAが検出され, B19の吸着に各細胞間で著明な差が認められた。一方, 感染実験ではKU812Ep6でのみ著明なB19複製が観察されたが, 他の細胞株では有意なコピー数の増加は認め難かった(表1)。

#### 【0049】



【表 1】

細胞株	由来	細胞表面 P抗原発現	B19	
			吸着	複製
KU812Ep6	赤芽球	++	++	+++
U937	単球	—	+	± ~—
H9	T細胞	—	+	± ~—
T24	膀胱上皮癌	+	±	±
SW620	大腸腺癌	+	±	±

## 【0050】

これらの細胞株におけるP抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析したところ、KU812Ep6、T24、SW620では細胞表面上にP抗原の発現が認められた。しかし、H9、U937ではP抗原の発現は認められなかった（図2）。B19複製はP抗原の発現が認められるKU812Ep6、T24、SW620のうちKU812Ep6でのみ観察され、P抗原の発現とB19複製が必ずしも一致しないこと、一方、P抗原発現が検出されないH9、U937細胞においてもB19吸着が観察されることからB19吸着、感染に参与するP抗原以外の分子の存在が示唆された。

## 【0051】

2-2. リコンビナントB19 エンプティカプシドプロテイン（empty capsid protein；rB19ECP）のH9細胞表面への結合

P抗原の発現が認められないにもかかわらず、KU812Ep6と同等のB19吸着を示すTリンパ球系細胞株H9を用いて、rB19ECP結合蛋白の同定を試みた。ビオチン化rB19ECPはH9細胞表面に濃度依存性に結合した。一方、対照であるビオチン化BSAのH9細胞表面への結合は観察されなかった（図3）。

## 【0052】

2-3. rB19ECP結合蛋白の分離と同定

まずH9細胞表面をビオチン化して、方法4.4(2)に基づき細胞溶解液を作製した。これをrB19ECP-セファロースと反応させ、rB19ECPと結合する蛋白の分離と同定を試みた。rB19ECP-セファロースに結合、沈降した蛋白はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により、80kDa付近に観察された。一方、対照のBSA-セファロースではこの蛋白を認めなかった。この80kDaの蛋白をリジルエンドペプチダーゼを用いてゲル内消化し、MALDI-TOF MS法にて解析した(図4)。SwissProtとNCBI nrの2つのデータベースとホモロジー検索をしたところ、80kDaの蛋白はKu80である可能性が高いとされた。

### 【0053】

#### 2-4. ウェスタンブロッティング解析によるrB19ECP結合蛋白の確認

rB19ECP-セファロースで沈降した80kDaの蛋白はウェスタンブロッティング解析にて抗Ku80抗体と反応した。またこの蛋白はH9細胞溶解液から抗Ku80抗体で免疫沈降してきた蛋白と一致しており、rB19ECP-セファロースに結合し沈降した80kDaの蛋白がKu80抗原であることが証明された(図5)。

### 【0054】

#### 2-5. B19とKu抗原の結合に関する確認実験

##### 1) リコンビナント蛋白による結合抑制実験

ビオチン化rKu80は固相化rB19ECPに濃度依存性に結合した(図6)。またこの結合は非標識rKu80により特異的に抑制され、対照であるrKu70、可溶性CD26での抑制は観察されなかった(図7)。

### 【0055】

##### 2) 精製B19ウイルスによる結合抑制実験

ビオチン化rKu80の固相化rB19ECPへの結合はB19急性感染血清から精製したB19ウイルスでも濃度依存性に抑制された(図8)。

### 【0056】

##### 3) 各種抗体による結合抑制実験

ビオチン化rKu80の固相化rB19ECPへの結合は抗Ku80抗体では抑制されたが、抗Ku70抗体、抗CD106抗体では抑制されなかった(図9)。また抗Ku80抗体による抑制は濃度依存性であった(図10)。

## 【0057】

## 2-6. 各細胞株表面におけるKu80抗原の発現

フローサイトメトリー解析により、KU812Ep6, H9, U937細胞株の細胞表面上にKu80抗原の発現が観察された。一方、T24, SW620では細胞表面上のKu80発現は認められなかった(図11、表2)。

## 【0058】

【表2】

細胞株	由来	細胞表面 P抗原発現	B19		細胞表面 Ku80抗原発現
			吸着	複製	
KU812Ep6	赤芽球	++	++	+++	+
U937	単球	—	+	± ~—	+
H9	T細胞	—	+	± ~—	+
T24	膀胱上皮癌	+	±	±	—
SW620	大腸腺癌	+	±	±	—

## 【0059】

## 2-7. KU812Ep6細胞へのB19 の結合とKu80の発現

蛍光抗体染色を用いて、KU812Ep6細胞へのrB19ECPの結合と細胞表面上のKu80発現の検出を試みた。共焦点にて、rB19ECPとKu80の局在が一致している細胞が観察された(図4のB)。

## 【0060】

## 2-8. B19感染におけるP抗原とKu抗原

同定されたKu抗原のB19感染における役割を検討するためにP及びKu抗原を発現し、B19複製能を有するKU812Ep6を用いて、B19吸着と感染実験で特異抗体の作用を検討した。Ku812Ep6へのB19吸着は、抗Ku80抗体により有意な抑制が認められたが、抗グロボシド抗体での抑制は明らかでなかった(図12)。一方、2日間培養した後、細胞内でのB19複製を定量PCRにて検出したところ、抗Ku80抗体、抗グ



ロボシド（P抗原）抗体存在下で、共にB19の複製は抑制された。また、両抗体同時存在下では、B19複製の抑制率は高められた（図 1 3）。

#### 【 0 0 6 1 】

##### 2-9. 骨髓血中でのKu80抗原の発現

Ku80抗原がin vivoでB19の増殖細胞を含む骨髓細胞で発現しているか、骨髓血中の細胞表面Ku80の発現をフローサイトメトリーにて解析した。その結果Ku80はGlycophorin Aを発現している赤芽球系の細胞で強い発現が認められた。さらにB細胞、T細胞、単球の細胞表面マーカーである、CD20、CD3、CD14陽性細胞においてもKu80の発現が認められた（図 1 4）。

#### 【 0 0 6 2 】

##### 2-10. 骨髓細胞でのB19感染とP及びKu抗原

骨髓サンプルを用いて、細胞株と同様にB19感染によるKu80及びPの関与様式を求めた。抗Ku80抗体、抗グロボシド抗体存在下で、それぞれ、99.0%、99.9%のB19ウイルスの複製が抑えられた。なお抗Ku80抗体、抗グロボシド抗体の両抗体を同時に添加しても、抗Ku80抗体、抗グロボシド抗体単独時に比べて、複製の抑制率に有意な相乗効果は認められなかった（表 3）。

#### 【 0 0 6 3 】

【表 3】

細胞	抗体	B19-DNAのコピー数
BM	(-)	$1041.5 \times 10^4$
BM	抗-CD106 抗体	$568.2 \times 10^4$
BM	抗-Ku80 抗体	$10.2 \times 10^4$ *
BM	GL4	$0.19 \times 10^4$ *
BM	抗-Ku80 抗体 GL4	$0.18 \times 10^4$ *

\*  $P < 0.01$ 

【0064】

## 3. 考察

本研究で、B19の細胞表面結合に関連してP抗原とは異なるB19感染関連分子としてKu80を特定した。Ku80は、B19の吸着が観察されるもののP抗原発現が認められないTリンパ球系細胞株H9からリコンビナントB19 エンプティカプシドプロテイン (empty capsid protein ; rB19ECP) に結合する分子として沈降し、MALDI-TOF MS法解析にて特定した。H9細胞におけるB19吸着は抗Ku80抗体5  $\mu\text{g/ml}$  存在下で60%抑制され (成績提示せず) , また抗Ku80抗体を用いたウエスタンブロット法においてrB19ECP結合分子は抗Ku80抗体と反応した。さらに、rB19ECPとrKu80を用いた競合ELISA法の結果より、rB19ECPへの結合分子がKu80であり、B19とKu80の結合が特異的であることが示された。

【0065】

Ku80はSLE例で認められる自己抗体の標的自己抗原として見いだされた80kDaの蛋白である。Ku80は細胞内蛋白として局在し、機能することが知られている。Ku80は、Ku70とヘテロダイマーを形成し (非特許文献19) , 細胞内でDNA依存性プロテインキナーゼの調節因子としてDNA修復や組換えに関与するとされている

(非特許文献 23、24)。一方Ku80は、低酸素環境下で血管内皮細胞やヒト筋肉腫細胞株RD細胞表面に発現が認められるようになり、リンパ球系細胞の接着に関係しているとの報告もある(非特許文献 25、26、27)。またヒト胃癌細胞株HGT-1細胞表面に発現しているKu80はソマトスタチンレセプターとして機能し、シグナル伝達に関与することが報告されている(非特許文献 28)。以上の報告にみられるように、Ku80は細胞表面で発現し、機能を有する場合が知られている。

#### 【0066】

本研究では、B19の吸着が観察されたKu812Ep6, H9, U937のいずれにおいても細胞表面にKu80の発現が認められた。H9, U937ではB19レセプターP抗原は検出されなかったことから、これらの細胞株でのB19吸着にはKu80が重要な役割を担っていると推定された。さらに、生体由来血液細胞でのKu80の発現を解析したところ、末梢血単核細胞では細胞表面に抗Ku80抗体で検出可能なKu80の発現を確認できる細胞集団は確認できなかった(成績提示せず)。しかし、骨髓由来細胞ではそれぞれ、赤芽球、単球、T細胞、B細胞、のマーカーであるGlycophorinA陽性細胞、CD14陽性細胞、CD3陽性細胞、CD20陽性細胞などで細胞表面にKu80の発現を認めた。これらの細胞表面でKu80が発現しているのは骨髓細胞が存在する生理環境が低酸素環境であることと関連があるのかもしれない。骨髓内での酸素分圧は5~7%O<sub>2</sub> (37~52mmHg)の状態とされている(非特許文献 29、30)。最近、B19の感染複製が低酸素環境下で亢進するとの事実も報告されている(非特許文献 31)。また、低酸素下でのB19感染複製亢進のメカニズムは現時点で不明であるが、骨髓などの低酸素環境で、本来細胞内に局在するKu80が細胞表面に表出されるためにB19感染効率が増加しB19の複製亢進に至る可能性があげられる。

#### 【0067】

細胞内蛋白であるKu80がどのような条件下で、どのようなメカニズムで細胞表面に表出されるようになるかは未だ、不明な部分が多く、細胞表面へのKu80発現メカニズムを理解することはB19感染を理解するうえで重要であり、さらなる研究が必要である。

#### 【0068】

さらにB19感染感受性細胞株Ku812Ep6を用いたB19吸着，感染抑制実験によりB19感染におけるKu80の役割を検討した。抗Ku80抗体存在下でのみB19吸着の抑制が観察された。B19複製抑制効果は抗Ku80抗体，抗グロボシド抗体存在下で，各々約20%，40%であった。抗グロボシド抗体の作用の相違が観察されたが，この理由として抗グロボシド抗体量がB19とグロボシドの結合を十分に抑制し得る濃度に達していなかった可能性があげられる。しかし，競合ELISA法によりB19とKu80の結合はグロボシドでは抑制されず，Ku80とグロボシドにつきB19は結合部位が異なると考えられる。このことから，抗グロボシド抗体によりグロボシドと結合し得なかったB19がKu80と結合したため，見かけ上，B19吸着コピー数に変化が認められなかった可能性も考えられる。一方，感染実験では抗グロボシド抗体によるB19複製抑制が認められている。これはグロボシドを介したB19感染効率がKu80を介した感染効率に比して高いことを示すものと推定される。また，抗Ku80抗体及び抗グロボシド抗体の両存在下ではB19複製抑制効果は，約60%にまで高められ，抗Ku80抗体が抗グロボシド抗体に対して相乗的抑制効果を示した。

#### 【 0 0 6 9 】

骨髓細胞を用いたB19感染実験においては，抗Ku80抗体単独でのB19複製抑制は99.0%であった。この抑制率は抗グロボシド抗体を加えた時と同程度であった。細胞株を用いて実験で認められた抗グロボシド抗体，抗Ku80抗体の両抗体存在下でのB19増殖抑制相乗効果は観察されなかったが，これは骨髓細胞におけるグロボシド，Ku80抗原の発現量の違い，さらにグロボシド，Ku80各々のB19感染効率の違いによる可能性があげられる。骨髓赤芽球系細胞はグロボシドを高発現している。また図4のC，図4のDの結果からグロボシドを介したB19感染効率はKu80を介した感染より高いことが示唆されることから，骨髓細胞を用いた感染実験の結果は主にグロボシドを介した赤芽球細胞へB19感染を反映したものと考えられる。従って，抗グロボシド抗体下では，赤芽球細胞への主なB19感染が効率よく抑制され，Ku80のB19感染への関わりを観察し難い条件になったものと考えられる。

#### 【 0 0 7 0 】

表1の結果から，B19がKu80単独陽性細胞に吸着し，グロボシド陽性細胞でも

Ku80発現陰性の場合ではB19吸着が少ないこと、かつ細胞株を用いた実験において、抗Ku80抗体単独でB19吸着抑制が観察されることより、Ku80はB19吸着に重要な役割を果たすと考えられる。さらに細胞株及び骨髓細胞を用いた感染実験において抗Ku80抗体単独でB19複製抑制が観察されたこと、抗Ku80抗体は抗グロボシド抗体に対して相乗的抑制効果として作用しうることなどから、細胞表面上のKu80発現はB19感染に影響を及ぼし、B19感染を規定する可能性がある。つまりKu80はB19感染関連分子として機能し、B19感染レセプターあるいは感染効率を高めるco-receptorの役割を果たすものと推定される。

#### 【 0 0 7 1 】

本発明ではKu80が生体内で骨髓中の赤芽球系細胞以外にも、T細胞、B細胞、単球表面上に発現されることを示した。我々はこれまでに、関節リウマチ例の関節滑膜組織中の免疫細胞で、B19DNA、RNA、B19-VP蛋白が検出できることを報告してきた<sup>10</sup>。これらの細胞ではP抗原の発現は乏しいとされているので、B19の免疫細胞への感染にはKu80が重要な役割を担っている可能性がある。Ku80を介したB19感染様式の存在はこれまで赤芽球とB19の関連のみでは理解が困難であったB19感染症の様々な病態の理解に貢献するのみならず、B19感染症の診断・治療にも有用な情報をもたらすものと期待される。

#### 【 0 0 7 2 】

##### 【発明の効果】

本発明により、新規なB 1 9レセプターが提供された。本発明のB 1 9レセプターは、B 1 9と特異的に結合するので、B 1 9測定用試薬やB 1 9吸着剤としての用途を有する。さらに、B 1 9レセプターと抗原抗体反応する抗体は、B 1 9の複製を抑制するので、B 1 9の感染抑制剤として用いることができる。

#### 【 0 0 7 3 】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING



<110> FUJIREBIO, INC.

<120> Novel human parvovirus B19 receptor and uses thereof

<130> 03865

<160> 5

【 0 0 7 4 】

<210> 1

<211> 732

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Val Arg Ser Gly Asn Lys Ala Ala Val Val Leu Cys Met Asp Val
1           5           10           15
Gly Phe Thr Met Ser Asn Ser Ile Pro Gly Ile Glu Ser Pro Phe Glu
           20           25           30
Gln Ala Lys Lys Val Ile Thr Met Phe Val Gln Arg Gln Val Phe Ala
           35           40           45
Glu Asn Lys Asp Glu Ile Ala Leu Val Leu Phe Gly Thr Asp Gly Thr
           50           55           60
Asp Asn Pro Leu Ser Gly Gly Asp Gln Tyr Gln Asn Ile Thr Val His
65           70           75           80
Arg His Leu Met Leu Pro Asp Phe Asp Leu Leu Glu Asp Ile Glu Ser
           85           90           95
Lys Ile Gln Pro Gly Ser Gln Gln Ala Asp Phe Leu Asp Ala Leu Ile
           100          105          110
Val Ser Met Asp Val Ile Gln His Glu Thr Ile Gly Lys Lys Phe Glu
           115          120          125
Lys Arg His Ile Glu Ile Phe Thr Asp Leu Ser Ser Arg Phe Ser Lys
           130          135          140
Ser Gln Leu Asp Ile Ile Ile His Ser Leu Lys Lys Cys Asp Ile Ser

```

145	150	155	160
Leu Gln Phe Phe Leu Pro Phe Ser Leu Gly Lys Glu Asp Gly Ser Gly			
	165	170	175
Asp Arg Gly Asp Gly Pro Phe Arg Leu Gly Gly His Gly Pro Ser Phe			
	180	185	190
Pro Leu Lys Gly Ile Thr Glu Gln Gln Lys Glu Gly Leu Glu Ile Val			
	195	200	205
Lys Met Val Met Ile Ser Leu Glu Gly Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ile			
	210	215	220
Tyr Ser Phe Ser Glu Ser Leu Arg Lys Leu Cys Val Phe Lys Lys Ile			
225	230	235	240
Glu Arg His Ser Ile His Trp Pro Cys Arg Leu Thr Ile Gly Ser Asn			
	245	250	255
Leu Ser Ile Arg Ile Ala Ala Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Arg Val			
	260	265	270
Lys Lys Thr Trp Thr Val Val Asp Ala Lys Thr Leu Lys Lys Glu Asp			
	275	280	285
Ile Gln Lys Glu Thr Val Tyr Cys Leu Asn Asp Asp Asp Glu Thr Glu			
	290	295	300
Val Leu Lys Glu Asp Ile Ile Gln Gly Phe Arg Tyr Gly Ser Asp Ile			
305	310	315	320
Val Pro Phe Ser Lys Val Asp Glu Glu Gln Met Lys Tyr Lys Ser Glu			
	325	330	335
Gly Lys Cys Phe Ser Val Leu Gly Phe Cys Lys Ser Ser Gln Val Gln			
	340	345	350
Arg Arg Phe Phe Met Gly Asn Gln Val Leu Lys Val Phe Ala Ala Arg			
	355	360	365
Asp Asp Glu Ala Ala Ala Val Ala Leu Ser Ser Leu Ile His Ala Leu			
	370	375	380

Asp Asp Leu Asp Met Val Ala Ile Val Arg Tyr Ala Tyr Asp Lys Arg  
385 390 395 400  
Ala Asn Pro Gln Val Gly Val Ala Phe Pro His Ile Lys His Asn Tyr  
405 410 415  
Glu Cys Leu Val Tyr Val Gln Leu Pro Phe Met Glu Asp Leu Arg Gln  
420 425 430  
Tyr Met Phe Ser Ser Leu Lys Asn Ser Lys Lys Tyr Ala Pro Thr Glu  
435 440 445  
Ala Gln Leu Asn Ala Val Asp Ala Leu Ile Asp Ser Met Ser Leu Ala  
450 455 460  
Lys Lys Asp Glu Lys Thr Asp Thr Leu Glu Asp Leu Phe Pro Thr Thr  
465 470 475 480  
Lys Ile Pro Asn Pro Arg Phe Gln Arg Leu Phe Gln Cys Leu Leu His  
485 490 495  
Arg Ala Leu His Pro Arg Glu Pro Leu Pro Pro Ile Gln Gln His Ile  
500 505 510  
Trp Asn Met Leu Asn Pro Pro Ala Glu Val Thr Thr Lys Ser Gln Ile  
515 520 525  
Pro Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Phe Pro Leu Ile Glu Ala Lys Lys  
530 535 540  
Lys Asp Gln Val Thr Ala Gln Glu Ile Phe Gln Asp Asn His Glu Asp  
545 550 555 560  
Gly Pro Thr Ala Lys Lys Leu Lys Thr Glu Gln Gly Gly Ala His Phe  
565 570 575  
Ser Val Ser Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Thr Ser Val Gly Ser Val  
580 585 590  
Asn Pro Ala Glu Asn Phe Arg Val Leu Val Lys Gln Lys Lys Ala Ser  
595 600 605  
Phe Glu Glu Ala Ser Asn Gln Leu Ile Asn His Ile Glu Gln Phe Leu

610	615	620
Asp Thr Asn Glu Thr Pro Tyr Phe Met Lys Ser Ile Asp Cys Ile Arg		
625	630	635
Ala Phe Arg Glu Glu Ala Ile Lys Phe Ser Glu Glu Gln Arg Phe Asn		640
	645	650
Asn Phe Leu Lys Ala Leu Gln Glu Lys Val Glu Ile Lys Gln Leu Asn		655
	660	665
His Phe Trp Glu Ile Val Val Gln Asp Gly Ile Thr Leu Ile Thr Lys		670
	675	680
Glu Glu Ala Ser Gly Ser Ser Val Thr Ala Glu Glu Ala Lys Lys Phe		685
	690	695
Leu Ala Pro Lys Asp Lys Pro Ser Gly Asp Thr Ala Ala Val Phe Glu		700
705	710	715
Glu Gly Gly Asp Val Asp Asp Leu Leu Asp Met Ile		720
	725	730

【 0 0 7 5 】

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3304

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

cgaccaaagc gcctgaggac cggcaac atg gtg cgg tcg ggg aat aag gca gct 54

Met Val Arg Ser Gly Asn Lys Ala Ala

1

5

gtt gtg ctg tgt atg gac gtg ggc ttt acc atg agt aac tcc att cct 102

Val Val Leu Cys Met Asp Val Gly Phe Thr Met Ser Asn Ser Ile Pro

10

15

20

25

ggt ata gaa tcc cca ttt gaa caa gca aag aag gtg ata acc atg ttt 150  
Gly Ile Glu Ser Pro Phe Glu Gln Ala Lys Lys Val Ile Thr Met Phe  
30 35 40

gta cag cga cag gtg ttt gct gag aac aag gat gag att gct tta gtc 198  
Val Gln Arg Gln Val Phe Ala Glu Asn Lys Asp Glu Ile Ala Leu Val  
45 50 55

ctg ttt ggt aca gat ggc act gac aat ccc ctt tct ggt ggg gat cag 246  
Leu Phe Gly Thr Asp Gly Thr Asp Asn Pro Leu Ser Gly Gly Asp Gln  
60 65 70

tat cag aac atc aca gtg cac aga cat ctg atg cta cca gat ttt gat 294  
Tyr Gln Asn Ile Thr Val His Arg His Leu Met Leu Pro Asp Phe Asp  
75 80 85

ttg ctg gag gac att gaa agc aaa atc caa cca ggt tct caa cag gct 342  
Leu Leu Glu Asp Ile Glu Ser Lys Ile Gln Pro Gly Ser Gln Gln Ala  
90 95 100 105

gac ttc ctg gat gca cta atc gtg agc atg gat gtg att caa cat gaa 390  
Asp Phe Leu Asp Ala Leu Ile Val Ser Met Asp Val Ile Gln His Glu  
110 115 120

aca ata gga aag aag ttt gag aag agg cat att gaa ata ttc act gac 438  
Thr Ile Gly Lys Lys Phe Glu Lys Arg His Ile Glu Ile Phe Thr Asp  
125 130 135

ctc agc agc cga ttc agc aaa agt cag ctg gat att ata att cat agc 486

Leu Ser Ser Arg Phe Ser Lys Ser Gln Leu Asp Ile Ile Ile His Ser

140

145

150

ttg aag aaa tgt gac atc tcc ctg caa ttc ttc ttg cct ttc tca ctt 534

Leu Lys Lys Cys Asp Ile Ser Leu Gln Phe Phe Leu Pro Phe Ser Leu

155

160

165

ggc aag gaa gat gga agt ggg gac aga gga gat ggc ccc ttt cgc tta 582

Gly Lys Glu Asp Gly Ser Gly Asp Arg Gly Asp Gly Pro Phe Arg Leu

170

175

180

185

ggt ggc cat ggg cct tcc ttt cca cta aaa gga att acc gaa cag caa 630

Gly Gly His Gly Pro Ser Phe Pro Leu Lys Gly Ile Thr Glu Gln Gln

190

195

200

aaa gaa ggt ctt gag ata gtg aaa atg gtg atg ata tct tta gaa ggt 678

Lys Glu Gly Leu Glu Ile Val Lys Met Val Met Ile Ser Leu Glu Gly

205

210

215

gaa gat ggg ttg gat gaa att tat tca ttc agt gag agt ctg aga aaa 726

Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ile Tyr Ser Phe Ser Glu Ser Leu Arg Lys

220

225

230

ctg tgc gtc ttc aag aaa att gag agg cat tcc att cac tgg ccc tgc 774

Leu Cys Val Phe Lys Lys Ile Glu Arg His Ser Ile His Trp Pro Cys

235

240

245

cga ctg acc att ggc tcc aat ttg tct ata agg att gca gcc tat aaa 822

Arg Leu Thr Ile Gly Ser Asn Leu Ser Ile Arg Ile Ala Ala Tyr Lys

250	255	260	265	
tcg att cta cag gag aga gtt aaa aag act tgg aca gtt gtg gat gca				870
Ser Ile Leu Gln Glu Arg Val Lys Lys Thr Trp Thr Val Val Asp Ala				
	270	275	280	
aaa acc cta aaa aaa gaa gat ata caa aaa gaa aca gtt tat tgc tta				918
Lys Thr Leu Lys Lys Glu Asp Ile Gln Lys Glu Thr Val Tyr Cys Leu				
	285	290	295	
aat gat gat gat gaa act gaa gtt tta aaa gag gat att att caa ggg				966
Asn Asp Asp Asp Glu Thr Glu Val Leu Lys Glu Asp Ile Ile Gln Gly				
	300	305	310	
ttc cgc tat gga agt gat ata gtt cct ttc tct aaa gtg gat gag gaa				1014
Phe Arg Tyr Gly Ser Asp Ile Val Pro Phe Ser Lys Val Asp Glu Glu				
	315	320	325	
caa atg aaa tat aaa tcg gag ggg aag tgc ttc tct gtt ttg gga ttt				1062
Gln Met Lys Tyr Lys Ser Glu Gly Lys Cys Phe Ser Val Leu Gly Phe				
330	335	340	345	
tgt aaa tct tct cag gtt cag aga aga ttc ttc atg gga aat caa gtt				1110
Cys Lys Ser Ser Gln Val Gln Arg Arg Phe Phe Met Gly Asn Gln Val				
	350	355	360	
cta aag gtc ttt gca gca aga gat gat gag gca gct gca gtt gca ctt				1158
Leu Lys Val Phe Ala Ala Arg Asp Asp Glu Ala Ala Ala Val Ala Leu				
	365	370	375	

tcc tcc ctg att cat gct ttg gat gac tta gac atg gtg gcc ata gtt 1206

Ser Ser Leu Ile His Ala Leu Asp Asp Leu Asp Met Val Ala Ile Val

380

385

390

cga tat gct tat gac aaa aga gct aat cct caa gtc ggc gtg gct ttt 1254

Arg Tyr Ala Tyr Asp Lys Arg Ala Asn Pro Gln Val Gly Val Ala Phe

395

400

405

cct cat atc aag cat aac tat gag tgt tta gtg tat gtg cag ctg cct 1302

Pro His Ile Lys His Asn Tyr Glu Cys Leu Val Tyr Val Gln Leu Pro

410

415

420

425

ttc atg gaa gac ttg cgg caa tac atg ttt tca tcc ttg aaa aac agt 1350

Phe Met Glu Asp Leu Arg Gln Tyr Met Phe Ser Ser Leu Lys Asn Ser

430

435

440

aag aaa tat gct ccc acc gag gca cag ttg aat gct gtt gat gct ttg 1398

Lys Lys Tyr Ala Pro Thr Glu Ala Gln Leu Asn Ala Val Asp Ala Leu

445

450

455

att gac tcc atg agc ttg gca aag aaa gat gag aag aca gac acc ctt 1446

Ile Asp Ser Met Ser Leu Ala Lys Lys Asp Glu Lys Thr Asp Thr Leu

460

465

470

gaa gac ttg ttt cca acc acc aaa atc cca aat cct cga ttt cag aga 1494

Glu Asp Leu Phe Pro Thr Thr Lys Ile Pro Asn Pro Arg Phe Gln Arg

475

480

485



tta ttt cag tgt ctg ctg cac aga gct tta cat ccc cgg gag cct cta 1542

Leu Phe Gln Cys Leu Leu His Arg Ala Leu His Pro Arg Glu Pro Leu

490 495 500 505

ccc cca att cag cag cat att tgg aat atg ctg aat cct ccc gct gag 1590

Pro Pro Ile Gln Gln His Ile Trp Asn Met Leu Asn Pro Pro Ala Glu

510 515 520

gtg aca aca aaa agt cag att cct ctc tct aaa ata aag acc ctt ttt 1638

Val Thr Thr Lys Ser Gln Ile Pro Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Phe

525 530 535

cct ctg att gaa gcc aag aaa aag gat caa gtg act gct cag gaa att 1686

Pro Leu Ile Glu Ala Lys Lys Lys Asp Gln Val Thr Ala Gln Glu Ile

540 545 550

ttc caa gac aac cat gaa gat gga cct aca gct aaa aaa tta aag act 1734

Phe Gln Asp Asn His Glu Asp Gly Pro Thr Ala Lys Lys Leu Lys Thr

555 560 565

gag caa ggg gga gcc cac ttc agc gtc tcc agt ctg gct gaa ggc agt 1782

Glu Gln Gly Gly Ala His Phe Ser Val Ser Ser Leu Ala Glu Gly Ser

570 575 580 585

gtc acc tct gtt gga agt gtg aat cct gct gaa aac ttc cgt gtt cta 1830

Val Thr Ser Val Gly Ser Val Asn Pro Ala Glu Asn Phe Arg Val Leu

590 595 600

gtg aaa cag aag aag gcc agc ttt gag gaa gcg agt aac cag ctc ata 1878

Val Lys Gln Lys Lys Ala Ser Phe Glu Glu Ala Ser Asn Gln Leu Ile	
605	610 615
aat cac atc gaa cag ttt ttg gat act aat gaa aca ccg tat ttt atg 1926	
Asn His Ile Glu Gln Phe Leu Asp Thr Asn Glu Thr Pro Tyr Phe Met	
620	625 630
aag agc ata gac tgc atc cga gcc ttc cgg gaa gaa gcc att aag ttt 1974	
Lys Ser Ile Asp Cys Ile Arg Ala Phe Arg Glu Glu Ala Ile Lys Phe	
635	640 645
tca gaa gag cag cgc ttt aac aac ttc ctg aaa gcc ctt caa gag aaa 2022	
Ser Glu Glu Gln Arg Phe Asn Asn Phe Leu Lys Ala Leu Gln Glu Lys	
650	655 660 665
gtg gaa att aaa caa tta aat cat ttc tgg gaa att gtt gtc cag gat 2070	
Val Glu Ile Lys Gln Leu Asn His Phe Trp Glu Ile Val Val Gln Asp	
670	675 680
gga att act ctg atc acc aaa gag gaa gcc tct gga agt tct gtc aca 2118	
Gly Ile Thr Leu Ile Thr Lys Glu Glu Ala Ser Gly Ser Ser Val Thr	
685	690 695
gct gag gaa gcc aaa aag ttt ctg gcc ccc aaa gac aaa cca agt gga 2166	
Ala Glu Glu Ala Lys Lys Phe Leu Ala Pro Lys Asp Lys Pro Ser Gly	
700	705 710
gac aca gca gct gta ttt gaa gaa ggt ggt gat gtg gac gat tta ttg 2214	
Asp Thr Ala Ala Val Phe Glu Glu Gly Gly Asp Val Asp Asp Leu Leu	

715

720

725

gac atg ata tag gtcgtggatg tatggggaat ctaagagagc tgccatcgct 2266

Asp Met Ile

730

gtgatgctgg gagttctaac aaaacaagtt ggatgcggcc attcaagggg agccaaaatc 2326

tcaagaaatt cccagcaggt tacctggagg cggatcatct aattctctgt ggaatgaata 2386

cacacatata tattacaagg gataatttag accccatata agtttataaa gagtcattgt 2446

tattttctgg ttggtgtatt attttttctg tggcttact gatctttgta tattacatac 2506

atgctttgaa gtttctggaa agtagatctt ttcttgacct agtatatcag tgacagttgc 2566

agcccttgtg atgtgattag tgtctcatgt ggaacatgg catggttatt gatgagtttc 2626

ttaacccttt ccagagtcct cctttgcctg atcctccaac agctgtcaca acttgtgttg 2686

agcaagcagt agcatttgct tcctcccaac aagcagctgg gttaggaaaa ccatgggtaa 2746

ggacggactc acttctcttt ttagttgagg ccttctagtt accacattac tctgcctctg 2806

tatataggtg gttttcttta agtgggggtg gaaggggagc acaatttccc ttcatactcc 2866

ttttaagcag tgagttatgg tgggtgtctc atgaagaaaa gaccttttgg cccaatctct 2926

gccatatcag tgaaccttta gaaactcaaa aactgagaaa ttacttcag tagttagaat 2986

tatatcactt cactgttctc tacttgcaag cctcaaagag agaaagtttc gttatattaa 3046

aacacttagg taacttttcg gtctttccca tttctaccta agtcagcttt catctttgtg 3106

gatggtgtct cctttactaa ataagaaaat aacaaagccc ttattctctt tttttcttgt 3166

cctcattctt gccttgagtt ccagttcctc tttggtgtac agacttcttg gtaccagtc 3226

acctctgtct tcagcacct cataagtcgt cactaatata cagttttgta catgtaacat 3286

taaaggcata aatgactc 3304

【 0 0 7 6 】

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for real-time detection PCR

<400> 3

ccctagaaaa cccatcctct gtg

23

【 0 0 7 7 】

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for real-time detection PCR

<400> 4

aggttctgca tgactgctac tgg

23

【 0 0 7 8 】

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide probe for real-time detection PCR

<400> 5

tcatggacag ttatctgacc accccca

27

【図面の簡単な説明】

【図 1】

各種細胞株における B 1 9 感染状態を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

【図 2】

各種細胞株における P 抗原の発現状態を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

**【図 3】**

H 9 細胞へのリコンビナント B 1 9 カプシド(rB19ECP)の結合を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

**【図 4】**

rB19ECP-Sepharose結合蛋白のマススペクトルを示す図である。

**【図 5】**

rB19ECP結合蛋白のWestern blot解析の結果を示す図である。

**【図 6】**

rB19ECPとビオチン化rKu80の結合実験の結果を示す図である。

**【図 7】**

rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(1)の結果を示す図である。

**【図 8】**

rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(2)の結果を示す図である。

**【図 9】**

rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(3)の結果を示す図である。

**【図 1 0】**

rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(4)の結果を示す図である。

**【図 1 1】**

各種細胞株における細胞表面Ku80の発現状態を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

**【図 1 2】**

KU812Ep6細胞株への B 1 9 吸着抑制実験の結果を示す図である。

**【図 1 3】**

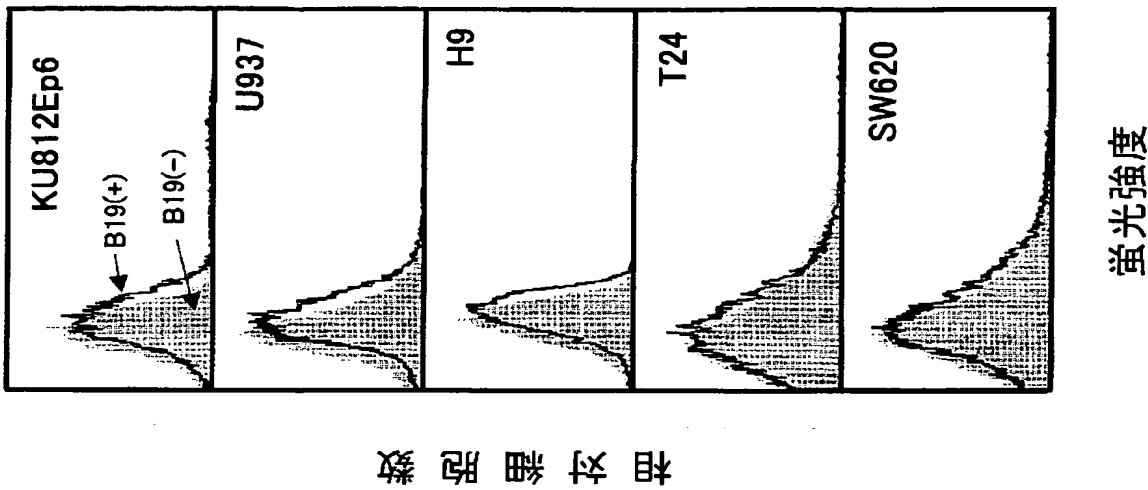
KU812Ep6細胞株への B 1 9 複製抑制実験の結果を示す図である。

**【図 1 4】**

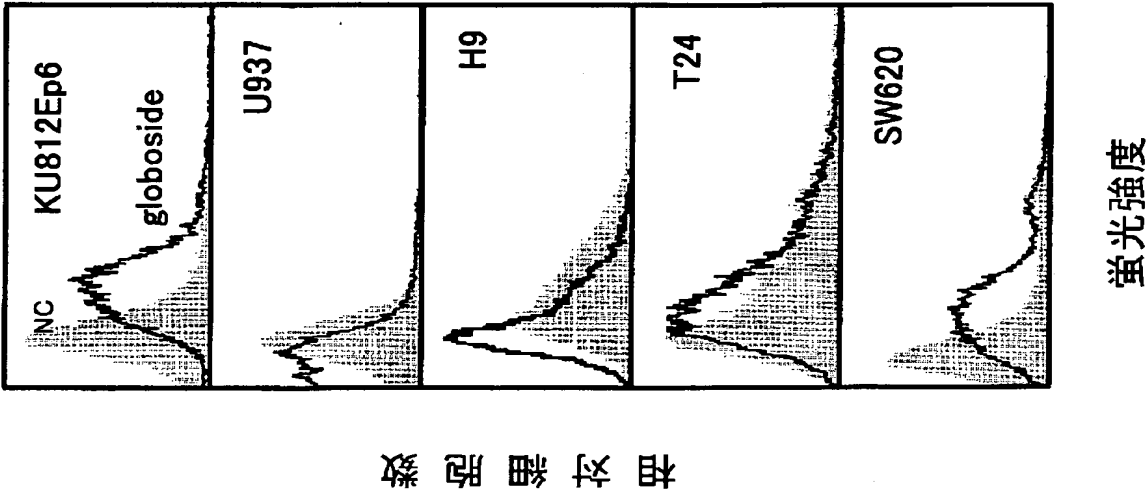
骨髓細胞表面のKu80の発現状態を示す図である。

【書類名】 図面

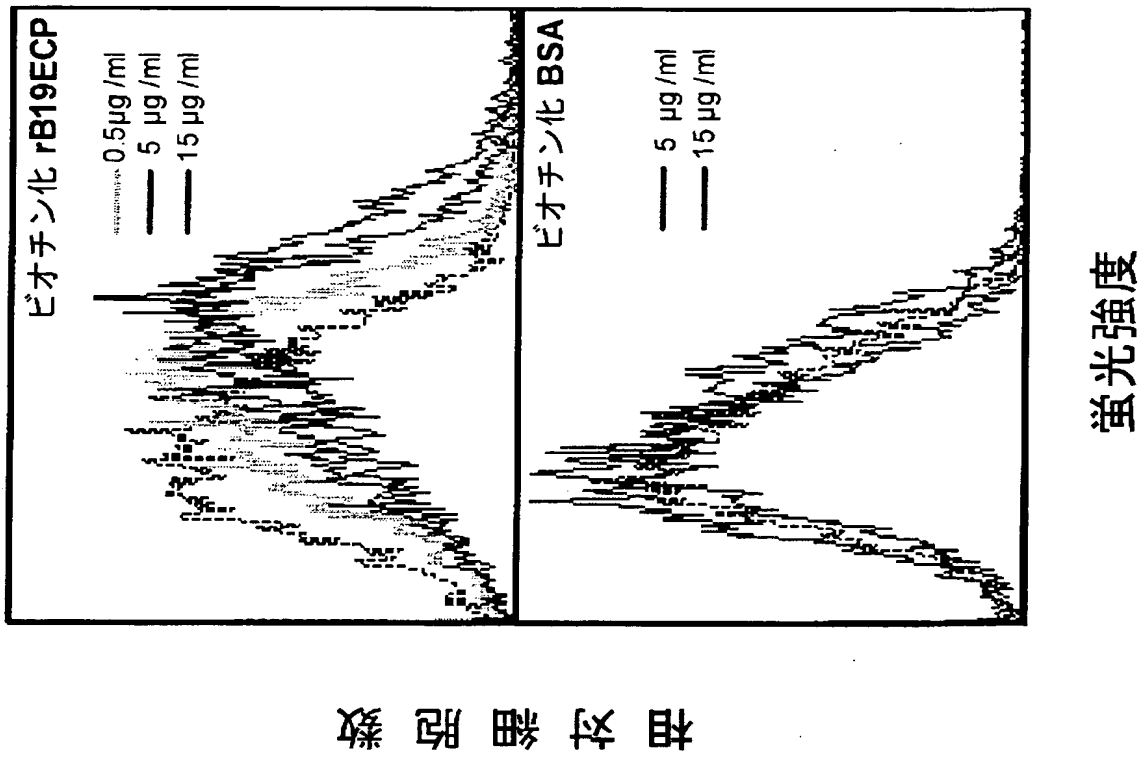
【図 1】



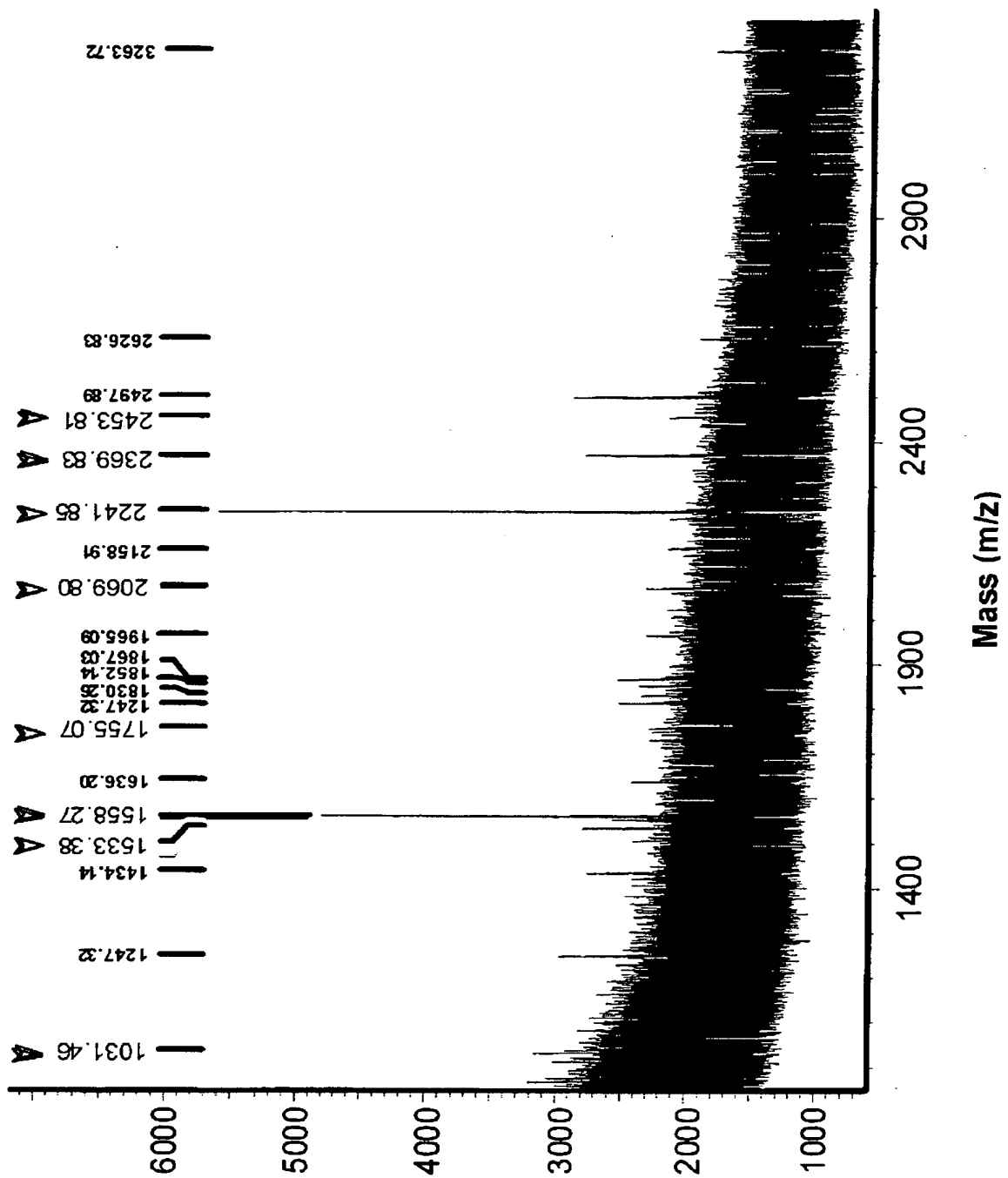
【図 2】



【図 3】

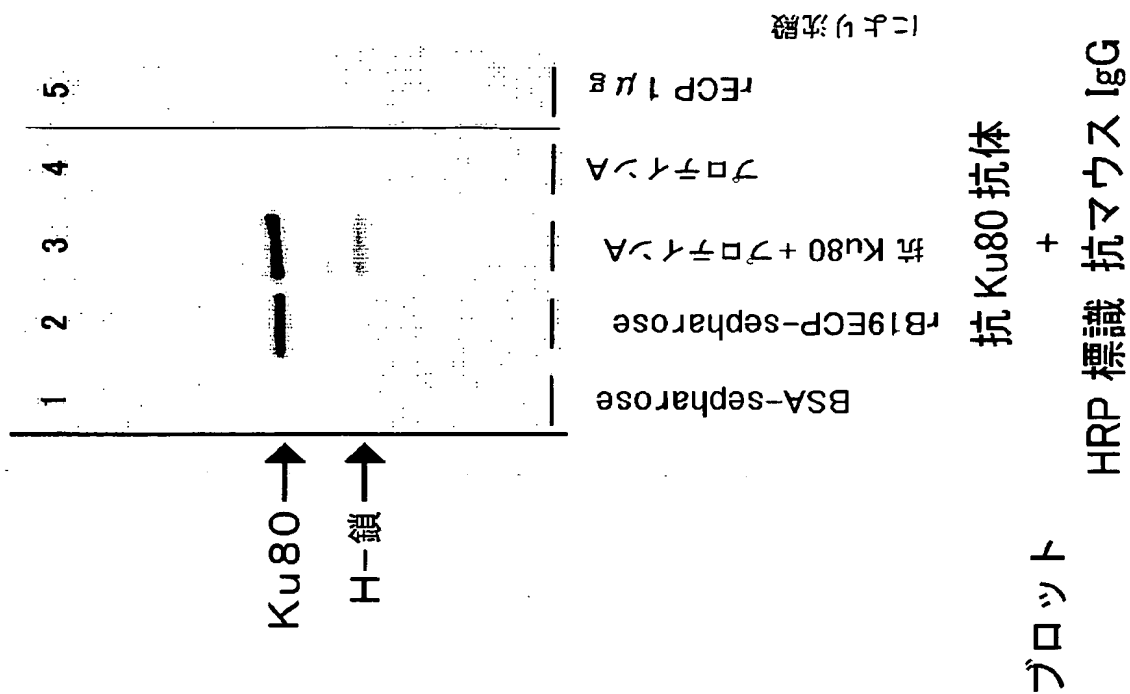


【図 4】

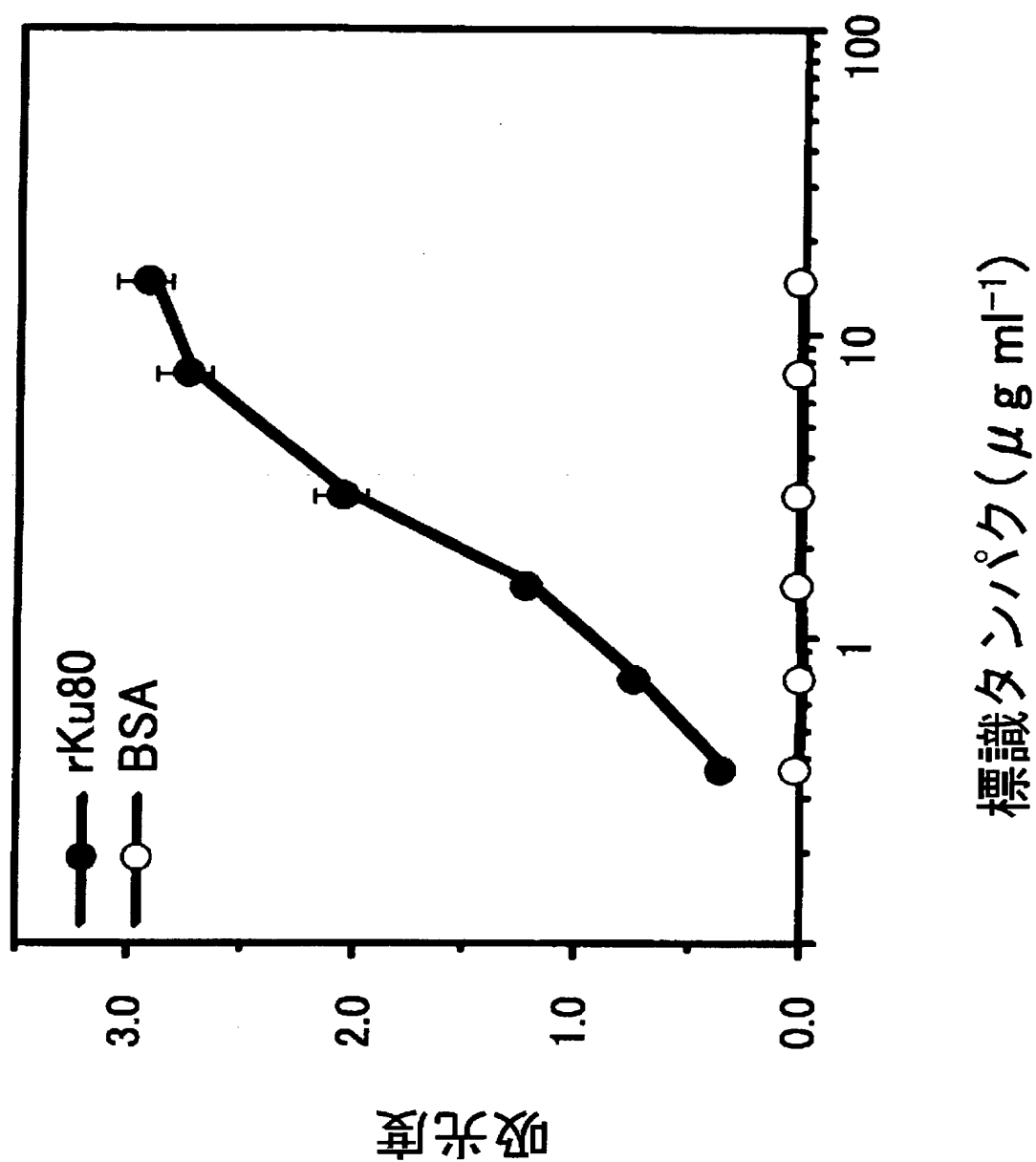




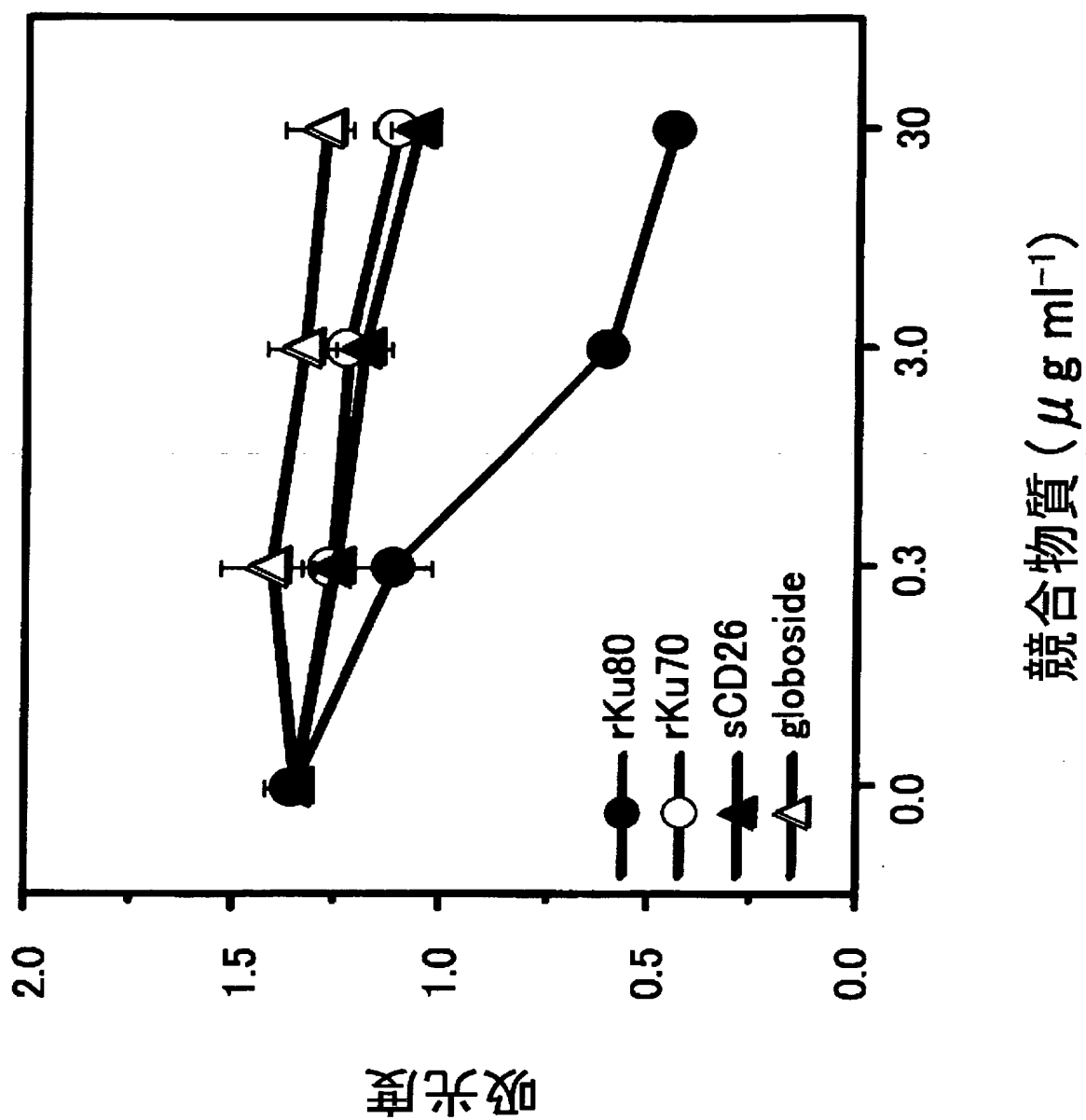
【図 5】



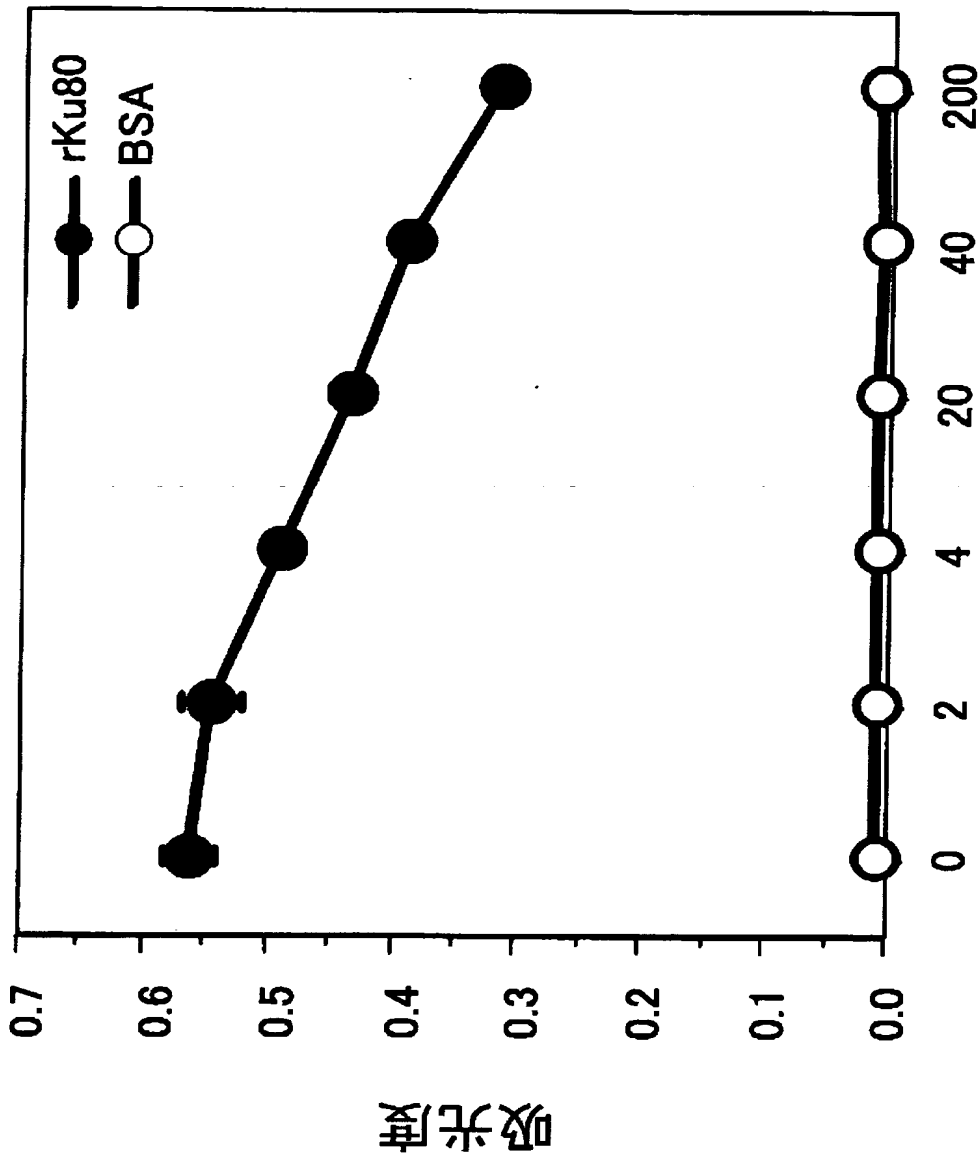
【図 6】



【図 7】

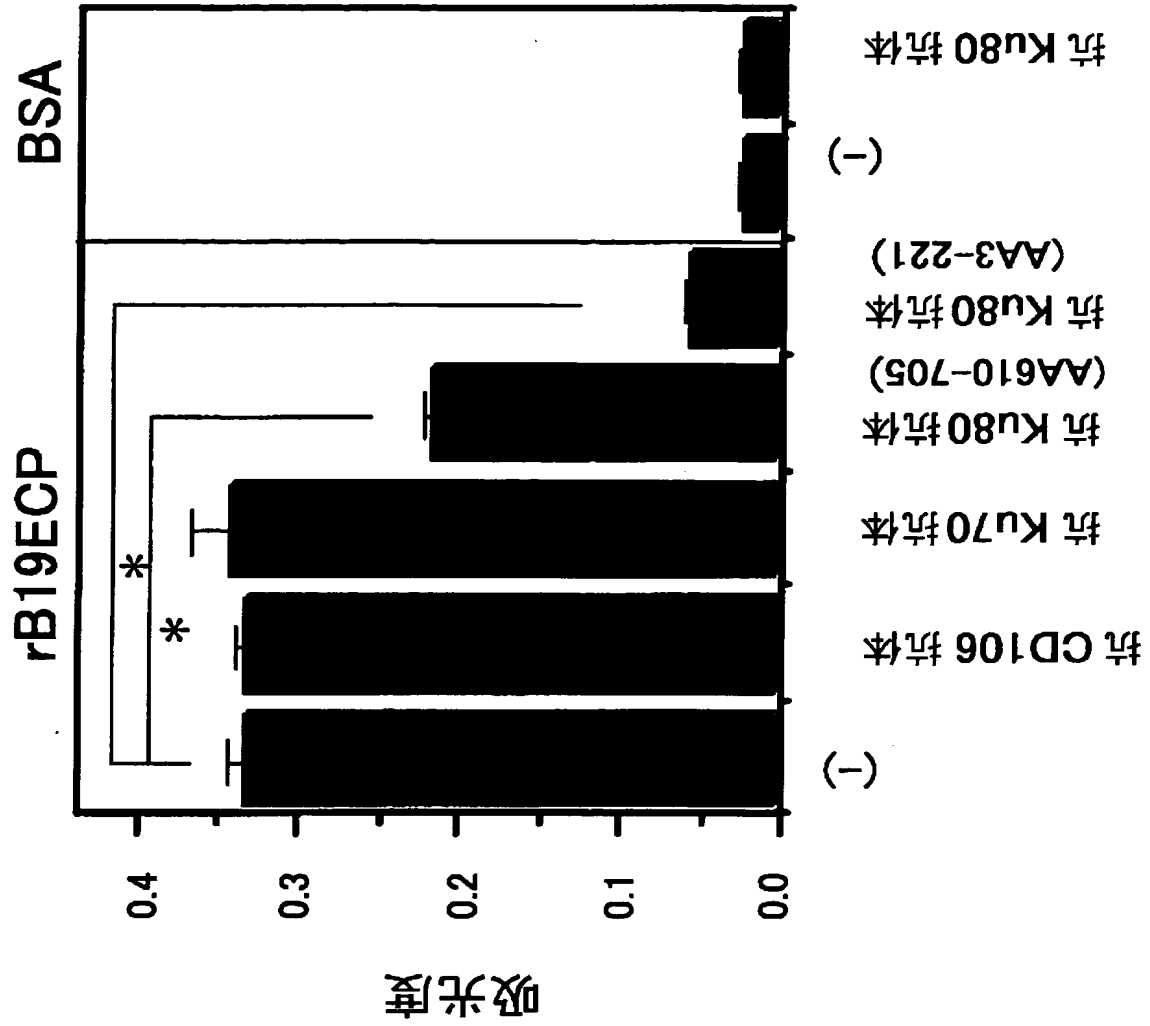


【図 8】

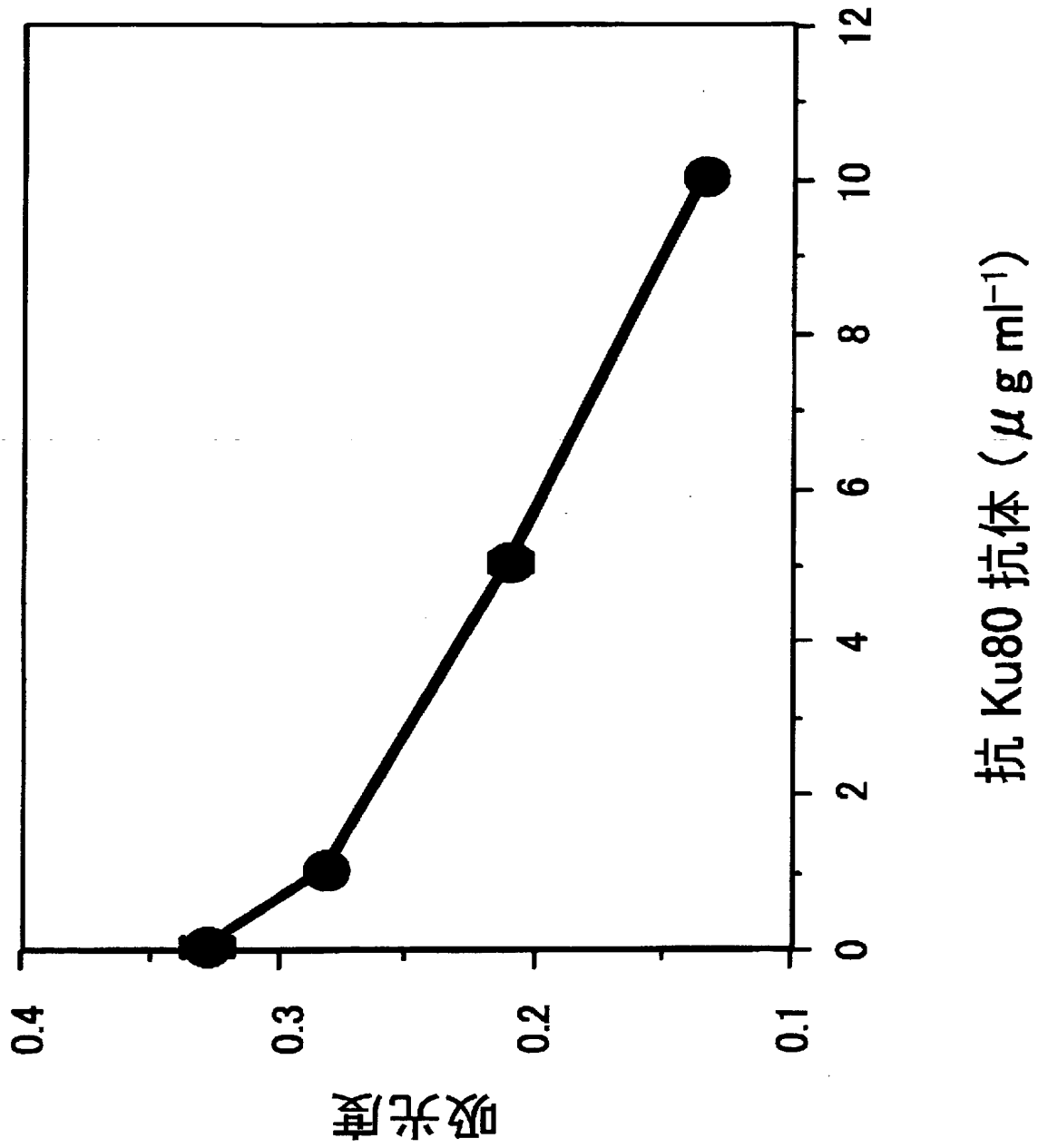


精製B19 (×10<sup>8</sup> B19-DNAのコピー数)

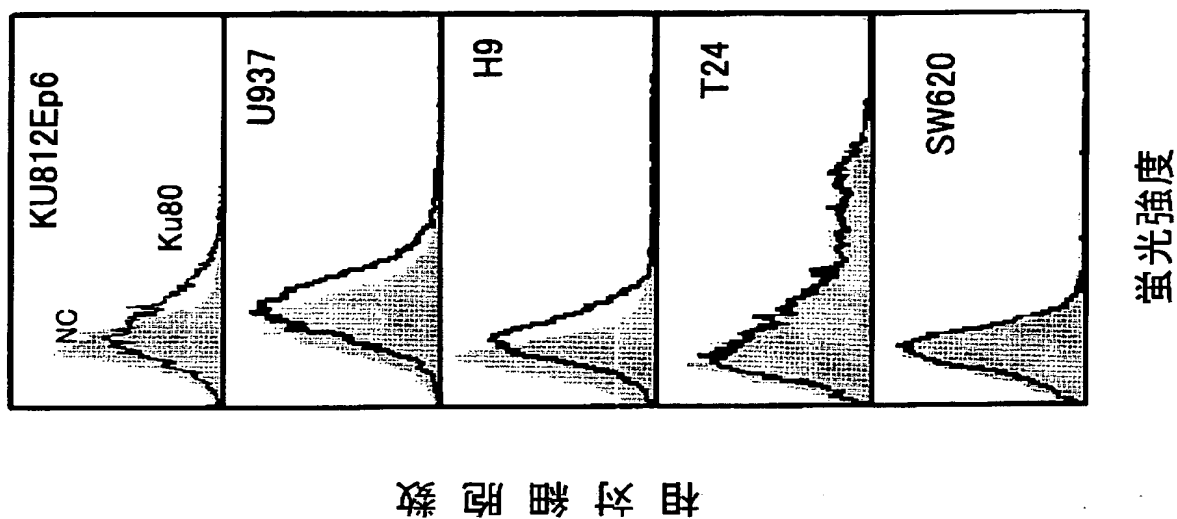
【図 9】



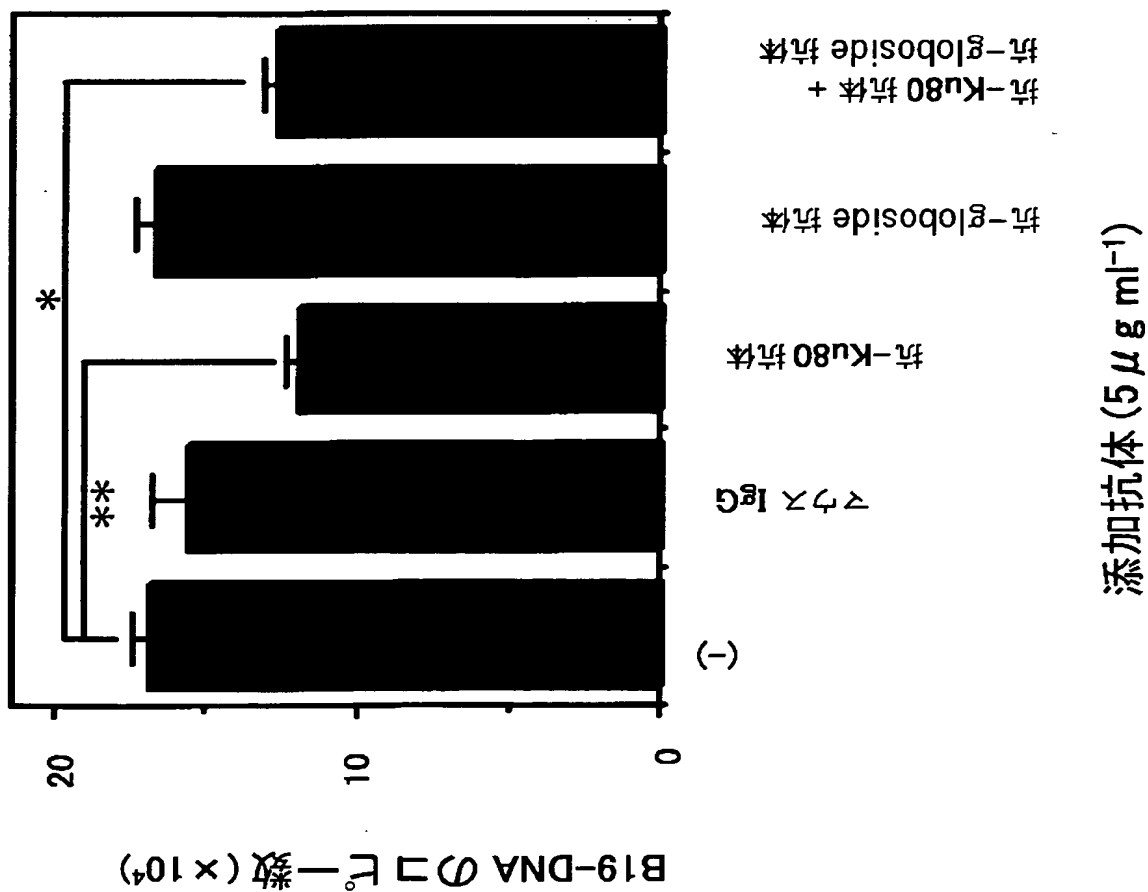
【図 10】



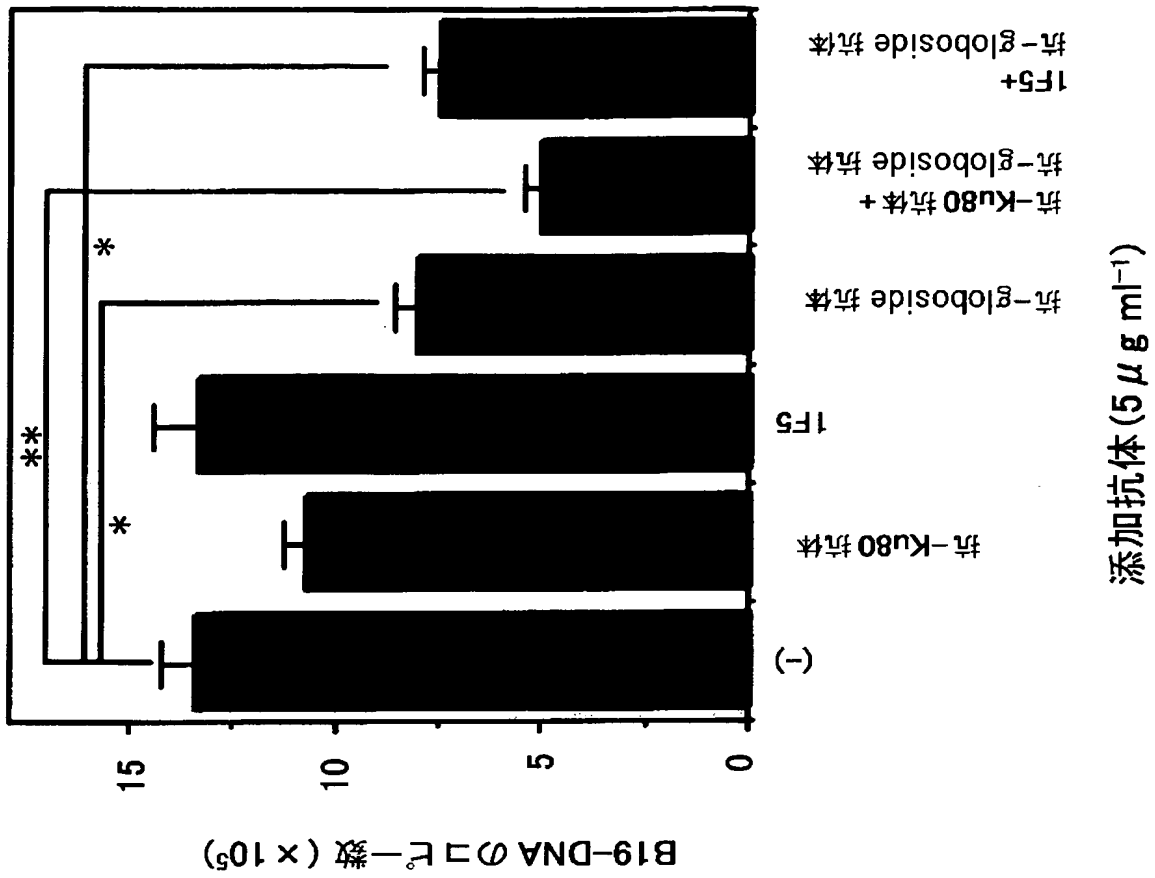
【図 1 1】



【図 1 2】

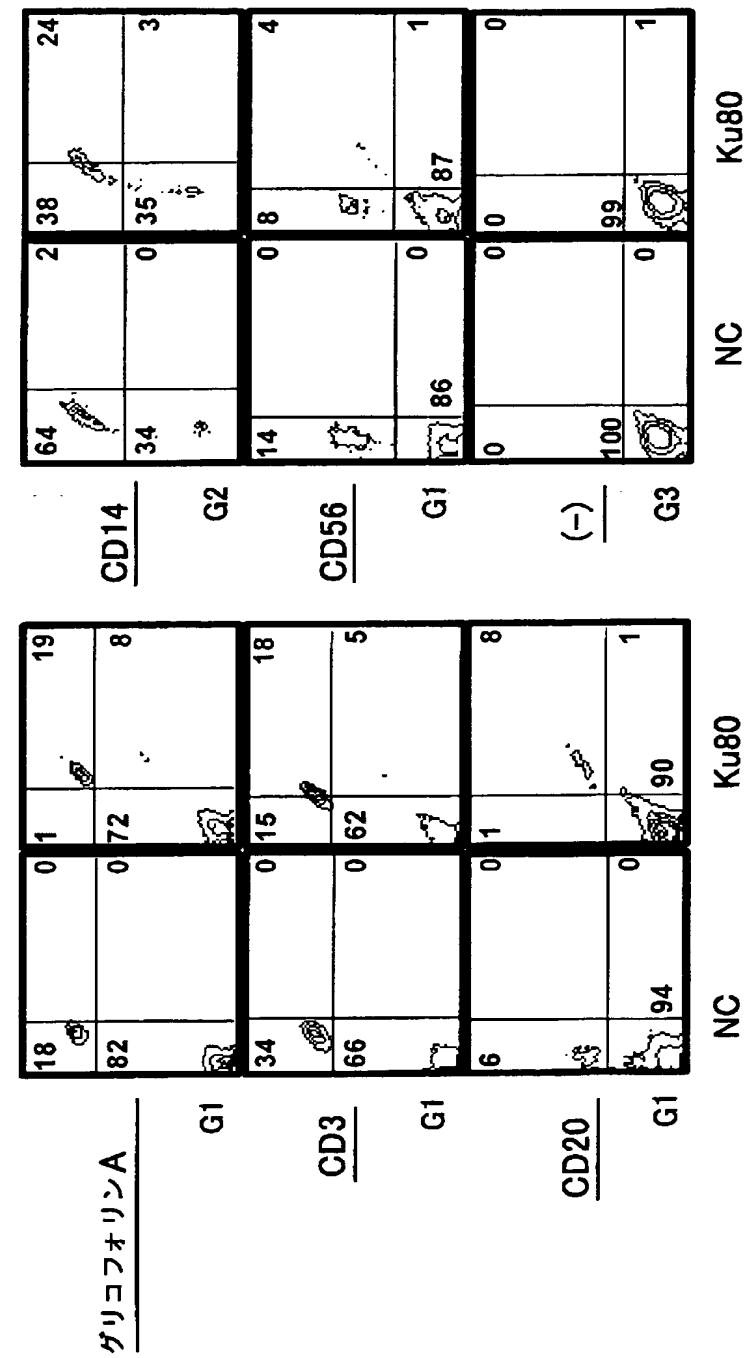


【図 13】





【図 14】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 P抗原以外の新規なヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提供すること、及び、該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを利用した、ヒトパルボウイルスB19を測定用試薬、吸着用試薬及び感染抑制剤を提供すること。

【解決手段】 本発明により、Ku80タンパクが、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターであることが見出された。従って、本発明は、Ku80から成る、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提供した。また、本発明は、Ku80から成るヒトパルボウイルスB19結合剤を提供する。さらに、本発明は、Ku80とヒトパルボウイルスB19の結合を阻害する物質又はその結合性断片を有効成分として含有するヒトパルボウイルスB19の感染抑制剤を提供する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 2 0 5 2 7 9
受付番号	5 0 3 0 1 2 7 8 7 6 0
書類名	特許願
担当官	関 浩次 7 4 7 5
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 7 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 8月 1日

特願 2 0 0 3 - 2 0 5 2 7 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 2 3 7 2 0 4 ]

1. 変更年月日

1 9 9 7 年 5 月 1 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号

氏 名

富士レビオ株式会社